



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DA
BIOENERGÉTICA DO EFLUXO PELO SISTEMA**

AcrAB-TolC EM *Escherichia coli*

SUSANA CRISTINA NUNES SANTOS COSTA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

OUTUBRO DE 2010



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DA
BIOENERGÉTICA DO EFLUXO PELO SISTEMA**

AcrAB-TolC EM *Escherichia coli*

SUSANA CRISTINA NUNES SANTOS COSTA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

Orientador: Professor Doutor Miguel Viveiros

Laboratório onde o trabalho experimental foi desenvolvido:

Unidade de Ensino e Investigação de Micobactérias

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

OUTUBRO DE 2010

Comunicações em congressos

Os resultados apresentados foram objecto de apresentação em co-autoria das seguintes comunicações em congressos, sobre a forma de Poster:

Susana Costa, Ana Martins, Gabriella Spengler, Leonard Amaral e Miguel Viveiros. 2009. Bioenergetic Characterization of efflux in *Escherichia coli* strains, *In Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* vol. 56 (suppl.) pp. 134. Second Central European Forum for Microbiology. Keszthely, Hungria, 7-9 Outubro 2009.

Susana Costa, Ana Martins, Gabriella Spengler, Leonard Amaral e Miguel Viveiros. 2009. ATPase inhibitors as new efflux pump inhibitors of *Escherichia coli*, *In* livro de abastracts do Congresso Nacional Microbiotec09. Vilamoura, Portugal, 28-30 Novembro 2009.

Ana Martins, Gabriella Spengler, Susana Costa, Miguel Viveiros e Leonard Amaral. 2009. Influence of Calcium and pH in the accumulation and efflux of ethidium bromide, *In* livro de abastracts do Congresso Nacional Microbiotec09. Vilamoura, Portugal, 28-30 Novembro 2009.

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos aqueles que participaram directa ou indirectamente e que estiveram ao meu lado durante a realização deste trabalho. Mais uma etapa concluída... e a muitos de vocês o devo... O meu sincero agradecimento a todos.

Ao meu orientador, Professor Doutor Miguel Viveiros, Director da Unidade de Micobactérias, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pela disponibilidade em partilhar o seu saber e pelo interesse demonstrado desde o primeiro momento. Pela paciência e empenhamento com que acompanhou a elaboração desta dissertação. Pelas suas palavras de incentivo que tornaram possíveis a sua realização, mesmo quando tudo parecia indicar o contrário. Obrigado por me ter ajudado a não desistir.

À Professora Doutora Isabel Couto, pela disponibilidade, sugestões e interesse demonstrado em todas as fases que levaram à concretização deste trabalho, e por todo o apoio que me concedeu desde o primeiro dia.

À Unidade de Ensino e Investigação de Micobactérias, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, pelas condições laboratoriais disponibilizadas, e a todos os colegas de laboratório pelo companheirismo e boa disposição com que fazem investigação e por estarem sempre dispostos a ensinar o que sabem.

À Ana Martins e Gabriella Spengler pela cumplicidade e espírito de entreajuda que sempre existiu entre nós durante a realização deste trabalho. “Köszönök mindent Ananak és Gabinak”. À Diana Machado e Sofia Costa, pela partilha de conhecimentos, pela ajuda e compreensão nos momentos difíceis. Diana, o empréstimo do computador foi uma ajuda preciosa, sem ele a fase final teria sido ainda mais caótica.

Às instituições organizadoras do Mestrado, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Faculdade de Ciências Médicas, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, e Faculdade de Ciências e Tecnologia, pela oportunidade cedida.

À Doutora Marta Martins, pelos conselhos sempre úteis, pelas palavras de apoio e pelo exemplo.

A todos os elementos da Unidade de Virologia, pelo apoio, motivação e amizade durante a realização deste projecto, pelos alegres momentos de descontração e camaradagem.

Aos meus amigos, pela constante motivação e por todos os momentos de convívio partilhados, mas acima de tudo obrigado por me entenderem.

A toda a família Nunes, um profundo e sincero obrigado pelo carinho, apoio e acima de tudo por acreditarem em mim.

Ao Mário, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, pela paciência, dedicação, incentivo e pelo seu apoio incondicional.

Aos meus pais, que tantos sacrifícios fizeram para eu chegar onde cheguei e que sempre me fizeram acreditar que só é impossível fazer o que não nos propomos seriamente fazer e a quem eu quero dedicar esta tese.

Muito obrigado a todos.

Resumo

A resistência aos antibióticos em bactérias Gram-negativas pode ser aumentada pela extrusão de antibióticos através de sistemas de efluxo. Em *Escherichia coli*, o principal sistema de efluxo é o AcrAB-TolC o qual tem como principal fonte energética a força proto-motriz. Este trabalho pretendeu estudar alguns aspectos essenciais da bioenergética na actividade de efluxo de *E. coli* usando três estirpes bem caracterizadas genotipica e fenotipicamente. Foi utilizado um método fluorimétrico semi-automático no qual a fluorescência do fluorocromo brometo de etídeo, substrato de bombas de efluxo foi seguida, permitindo a medição em tempo real da actividade de efluxo e acumulação de fluorocromo (inibição do efluxo). A utilização de brometo de etídeo é particularmente vantajosa pois emite baixa fluorescência no exterior da célula bacteriana tornando-se extremamente fluorescente no seu interior. Este método é uma nova aplicação do termociclador em tempo real RotorGene™ 3000 que permite o cálculo da cinética de transporte reflectindo o balanço entre acumulação de substrato por difusão passiva através da membrana e a sua extrusão/efluxo, proporcionando uma detecção rápida e económica de inibidores de efluxo.

Os resultados obtidos mostram, para todas as estirpes, que a GLU e o pH afectam a acumulação e o efluxo do brometo de etídeo. De todos os inibidores de vias biossintéticas testados, o ortovanadato de sódio, foi o que demonstrou maior actividade inibitória, a qual é revertida na presença de GLU. Em conclusão, este estudo mostra que a actividade de efluxo de *E. coli* depende não só da fosforilação oxidativa por via da força proto-motriz mas também da energia proveniente da hidrólise de ATP pelas ATPases. O ortovanadato de sódio tem potencial para ser um novo inibidor de bombas de efluxo de largo espectro. A tecnologia utilizada neste trabalho demonstrou ser apropriada para a caracterização bioenergética da actividade de bombas de efluxo e permite a selecção de novos inibidores de bombas de efluxo em bactérias.

Abstract

Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria can be increased by extrusion of the antibiotic through efflux systems. In *Escherichia coli*, the major efflux pump system is the AcrAB-TolC which is mainly driven by energy coming from the proton motive force. In this work was studied basic aspects of the bioenergetics of the efflux activity of *E. coli* using three genotypically and phenotypically well characterized strains. It was used the semi-automated fluorimetric method that utilizes the fluorochrome ethidium bromide, a known fluorescent efflux pump substrate, which allows the real time measurement of efflux activity and efflux inhibition (accumulation). Ethidium bromide has been shown to be particularly suitable to be used as a probe because it emits weak fluorescence outside the bacterial cell and becomes strongly fluorescent inside the cell. This method is a new application of the RotorGeneTM 3000 real-time thermocycler and provides the sum of transport kinetics reflecting the balance between accumulation of substrate via passive diffusion through the membrane permeability barrier and extrusion *via* efflux, thereby offers a rapid and inexpensive screening of inhibitors.

The results obtained show, for all strains, that GLU and pH affects the accumulation and efflux of ethidium bromide. From all the inhibitors of energy biosynthetic pathways tested, sodium orthovanadate was the one that revealed the highest inhibitory activity and this inhibitory effect was reversed by the presence of GLU in the medium. In conclusion, this study shows the dependence of the efflux activity of *E. coli* on energy from the hydrolysis of ATP by the ATPases, besides the already known dependence on the oxidative phosphorylation, to maintain the proton motive force of the cells. Sodium orthovanadate has potential to be a new broad range efflux-pump inhibitor. The technology used in this work showed to be suitable for the characterization of the bioenergetic requirements of the bacterial efflux pump activity, allowing the screening of new efflux pump inhibitors.

Índice Geral

Comunicações em congressos	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	1
1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.2. Parede celular	2
1.1.3. Importância clínica e terapêutica	5
1.1.4. Mecanismos de acção, e resistência	5
1.2. Sistemas de efluxo e sua presença em <i>E. coli</i>	8
1.2.1. Superfamília "ATP-binding cassette" (ABC)	10
1.2.2. Superfamília "Major Facilitator" (MFS)	11
1.2.3. Família "Multidrug and Toxic Compound Extrusion" (MATE)	11
1.2.4. Família "Small Multidrug Resistance" (SMR)	12
1.2.5. Superfamília "Resistance Nodulation Division" (RND)	12
1.3. Bioenergética bacteriana	16
1.3.1. ATPases, gradiente electroquímico de protões e força proto-motriz (FPM)	18
1.3.2. Desacopladores	24
1.3.2.1. Mecanismo de acção / Efeito bioenergético do CCCP	26
1.3.3. Inibidores das ATPases membranares	28
1.3.3.1. Ortovanadato de Sódio	28
1.3.3.1.1. Mecanismo de acção	29
1.3.3.2. Azida de Sódio	30
1.3.3.2.1. Mecanismo de acção	30

1.3.4. Inibidores (das ATPases dependentes) dos canais de cálcio	30
1.3.4.1. Mecanismo de acção	31
1.3.4.2. Clorpromazina (CPZ)	32
1.3.4.3. Tioridazina (TZ)	32
1.4. Metodologias de detecção do efluxo em bactérias	33
1.4.1. Método fluorimétrico semi-automático para monitorização do transporte de brometo de etídeo através de membranas e paredes celulares	34
1.5. Objectivos do trabalho	37
 2. MATERIAL E MÉTODOS	 40
2.1. Material	40
2.1.1. Estirpes Bacterianas	40
2.1.2. Meios de cultura, compostos e soluções	40
2.2. Métodos	44
2.2.1. Cultivo das Estirpes Bacterianas	44
2.2.2. Determinação de CMI (Concentração Mínima Inibitória) pelo método de diluição em microplaca (microdiluição) para as três estirpes de <i>E. coli</i> em estudo	44
2.2.3. Determinação de CMB (Concentração Mínima Bactericida) para as três estirpes de <i>E. coli</i> em estudo	46
2.2.4. Fluorimetria em Termociclador de Tempo Real Rotor-Gene™ 3000	47
2.2.4.1. Protocolo de acumulação de brometo de etídeo	47
2.2.4.2. Determinação da viabilidade celular	49
 3. RESULTADOS	 50
3.1. Determinação das concentrações mínimas inibitórias e concentrações mínimas bactericidas dos compostos em estudo para as estirpes AG100, AG100A e AG100 _{TET}	50
3.2. Aplicação do método fluorimétrico semi-automático para monitorização do transporte de brometo de etídeo	54
3.2.1. Parâmetros base na caracterização do transporte de EtBr	54
3.2.2. Influência de desacopladores na acumulação de EtBr	57
3.2.3. Influência de Inibidores de ATPases membranares na acumulação de EtBr	63

3.2.4. Influência de compostos que inibem os canais de cálcio na acumulação de EtBr	70
3.3. Influência de diversos inibidores na acumulação de EtBr a pH 5, pH 7 e pH 8	74
3.3.1. Influência do desacoplador CCCP na acumulação de EtBr a pH 5, pH 7 e pH 8	75
3.3.2. Influência de inibidores de ATPase na acumulação de EtBr a pH 5, pH 7 e pH 8	77
3.3.3. Influência do inibidor de canais de cálcio CPZ na acumulação de EtBr a pH 5, pH 7 e pH 8	79
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	81
4.1. Perspectivas Futuras	86
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

Índice de Figuras

Figura 1. Fotografia de microscopia electrónica de colónias de <i>E. coli</i>	2
Figura 2. Representação esquemática da parede celular de bactérias Gram-negativas	3
Figura 3. Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência a antibióticos	7
Figura 4. Representação esquemática e simplificada das cinco famílias de bombas de efluxo bacterianas (MFS, SMR, MATE, RND, ABC)	10
Figura 5. Representação esquemática do sistema de efluxo tripartido AcrAB-TolC de <i>E. coli</i>	13
Figura 6. Representação da membrana citoplasmática de <i>E. coli</i> com a maquinaria necessária à produção de ATP	17
Figura 7. Estrutura das ATPases de transporte	19
Figura 8. Representação esquemática da função fisiológica da F-ATPase	20
Figura 9. Estrutura da F ₁ F ₀ -ATPase de <i>E. coli</i>	21
Figura 10. Características gerais da estrutura da P-ATPase	23
Figura 11. Estrutura química do composto 2,4-dinitrofenol	25
Figura 12. Estrutura química do composto CCCP	26
Figura 13. Efeito bioenergético dos protonóforos	27
Figura 14. Estrutura química do composto ortovanadato de sódio	28
Figura 15. Estrutura química do composto azida de sódio	30
Figura 16. Estrutura química do composto clorpromazina	32
Figura 17. Estrutura química do composto tioridazina	33
Figura 18. Representação esquemática da entrada e efluxo de EtBr na célula de <i>E. coli</i>	35
Figura 19. Gráfico ilustrativo de um ensaio de acumulação de EtBr	36
Figura 20. Representação esquemática dos alvos celulares dos compostos CCCP, 2,4-DNP, ortovanadato de sódio, azida de sódio, TZ e CPZ	38
Figura 21. Monitorização da intensidade de fluorescência dos controlos a 37°C, ao comprimento de onda de excitação de 530 nm bp e de emissão de 585 nm hp	57

Figura 22. Influência do 2,4-dinitrofenol na acumulação de EtBr	58
Figura 23. Influência do 2,4-dinitrofenol na acumulação de EtBr	59
Figura 24. Influência do CCCP na acumulação de EtBr	61
Figura 25. Influência do CCCP na acumulação de EtBr	62
Figura 26. Influência da azida de sódio na acumulação de EtBr	64
Figura 27. Influência da azida de sódio na acumulação de EtBr	65
Figura 28. Influência do ortovanadato de sódio na acumulação de EtBr	67
Figura 29. Influência do ortovanadato de sódio na acumulação de EtBr	68
Figura 30. Influência da clorpromazina na acumulação de EtBr	70
Figura 31. Influência da clorpromazina na acumulação de EtBr	71
Figura 32. Influência da tioridazina na acumulação de EtBr	72
Figura 33. Influência da tioridazina na acumulação de EtBr	73
Figura 34. Influência do pH na acumulação de EtBr na presença de CCCP	75
Figura 35. Influência do pH na acumulação de EtBr na presença de ortovanadato de sódio.	77
Figura 36. Influência do pH na acumulação de EtBr na presença de Clorpromazina	79

Índice de Tabelas

Tabela 1. Composição de meios de cultura utilizados	41
Tabela 2. Composição e modo de preparação de soluções utilizadas	41
Tabela 3. Composição e modo de preparação das soluções de desacopladores, soluções de inibidores de cadeia transportadora de electrões, soluções de inibidores de ATPases e soluções de inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio utilizadas	42
Tabela 4. Composição e modo de preparação de soluções de substratos de bombas de efluxo utilizadas	43
Tabela 5. Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizadas	43
Tabela 6. Gama de concentrações dos compostos utilizados	45
Tabela 7. Valores de CMI obtidos para substratos de bombas de efluxo, desacopladores, inibidores de ATPase e inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio nas três estirpes de <i>E. coli</i> em estudo	51
Tabela 8. Valores de CMB obtidos para substratos de bombas de efluxo, desacopladores, inibidores de ATPase e inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio nas três estirpes de <i>E. coli</i> em estudo	52

Lista de Abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato, do inglês “adenosine 5’-triphosphate”
ATPase	Adenosina trifosfatase, do inglês “adenosine triphosphatase”
ABC	Adenosine triphosphate (ATP)-Binding Cassette
ADP	Adenosina difosfato, do inglês “adenosine diphosphate”
BE	Bomba de efluxo
bp	“band-pass”
CCCP	Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona
C_f	Concentração final
CLSI	“Clinical and laboratory standards institute”
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
CPZ	Clorpromazina
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”
DO	Densidade óptica
2,4-DNP	2,4-dinitrofenol, do inglês “2,4-dinitrophenol”
EC	Número EC, do inglês “Enzyme Commission number”
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês “ethylenediamine tetraacetic acid”
EtBr	Brometo de etídeo, do inglês “ethidium bromide”
ETC	Cadeia transportadora de electrões, do inglês “electronic transport chain”
FPM	Força proto-motriz
g	grama
GLU	Glucose
hp	“high-pass”
IBE	Inibidor de bomba de efluxo
KAN	Canamicina, do inglês “kanamycin”
KDa	Kilodalton
L	Litro
LA	Luria Bertani agar

LB	Luria Bertani broth
LPS	Lipopolissacárido
M	Molar
MATE	“Multidrug and toxic compound extrusion”
MDR	Resistência a múltiplos compostos, do inglês “multidrug resistance”
MFP	Proteína membrana de fusão, do inglês “membrane fusion protein”
MFS	“Major facilitator superfamily”
MHA	“Mueller-Hinton agar”
MHB	“Mueller-Hinton broth”
μL	microlitro
mg	miligrama
mL	mililitro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, do inglês “methicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ”
NaN₃	Azida de sódio
Na₃VO₄	Ortovanadato de sódio
OMP	Proteína membrana externa, do inglês “outer membrane protein”
P_i	Fosfato inorgânico, do inglês “inorganic phosphate”
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês “phosphate buffered saline”
pm	Peso molecular
QACs	Compostos quaternários de amônia, do inglês “Quaternary Ammonium Compounds”
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês “ribonucleic acid”
RND	“Resistance nodulation division”
SMR	“Small multidrug resistance”
TET	Tetraciclina
TZ	Tioridazina
v	volume
Δμ_H⁺	Gradiente protónico transmembrana
ΔpH	Diferença de pH
Δψ	Potencial de membrana

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Enterobacteriaceae*

As bactérias entéricas pertencem a uma família numerosa e são caracterizadas fenotipicamente por serem bacilos Gram-negativos, aeróbios facultativos, não esporogénicos, imóveis ou móveis, com flagelos peritricos, fermentadores da glucose, produtores de catalase e citocromo-oxidase negativo, (23, 64) com requisitos nutricionais relativamente simples (64). Os principais géneros de microrganismos patogénicos desta família são *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* (23).

Estes microrganismos são responsáveis por variadas infeções no ser humano (infeção urinária, entérica, etc.) que se caracterizam por uma elevada morbilidade e mortalidade.

A antibioterapia das infeções por *Enterobacteriaceae* constitui presentemente um sério problema de Saúde Pública, dada a elevada resistência das estirpes bacterianas aos principais grupos de antibióticos (β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos), sobretudo em ambiente hospitalar (23, 95, 100).

1.1.1. *Escherichia coli*

E. coli foi identificada pela primeira vez pelo pediatra Alemão Theodor Escherich em 1885, tendo sido originalmente denominada de *Bacterium coli commune*. Desde 1920, que *E. coli* tem sido um organismo útil para estudos de fisiologia bacteriana, pois era facilmente acessível, geralmente não patogénico, e crescia rapidamente em meios com requisitos nutricionais simples. Por tudo isso e devido à sua enorme plasticidade metabólica é ainda hoje um aliciente modelo para estudos em microbiologia e em bioquímica microbiana (5, 101).

E. coli é um bacilo Gram-negativo de 1.1 a 1.5 μm de largura e 2.0 a 6.0 μm de comprimento (101). Possui flagelos dispostos em torno da célula que lhe permitem a mobilidade. A existência de fimbrias ou adesinas facilitam a sua fixação o que impede o seu arrastamento pela urina ou fezes líquidas. O nucleóide contém uma única molécula de DNA circular (já sequenciado) e o citoplasma contém um ou mais plasmídeos. Possui uma grande quantidade de ribossomas, o que é uma evidência da elevada capacidade de resposta metabólica desta bactéria (52, 56).

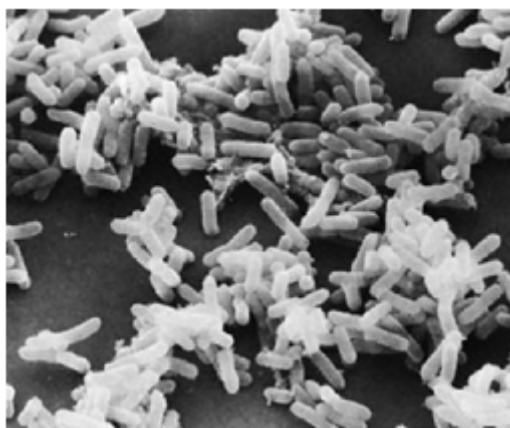


Figura 1 - Fotografia de microscopia eletrônica de colônias de *E. coli* (x14000) (adaptado de 101).

1.1.2. Parede celular

Tal como as restantes bactérias Gram-negativas, *E. coli* caracteriza-se por possuir uma parede celular complexa, constituída por regiões morfologicamente definidas. A camada mais interna é a membrana plasmática, uma bicamada que contém fosfolípidos e proteínas de membrana, é semipermeável e regula a passagem de metabolitos para dentro e para fora do citoplasma (73, 113), de forma a regular o pH, a pressão osmótica e a disponibilidade de substâncias essenciais. Exteriormente a esta membrana encontra-se a camada de peptidoglicano, que serve como um “exoesqueleto”, que mantém a forma celular e rigidez. As bactérias Gram-negativas têm uma camada relativamente fina de peptidoglicano o que confere menos rigidez comparativamente com a camada mais espessa de peptidoglicano das bactérias Gram-positivas (113).

A camada de lipopolissacáridos (LPS) está localizada adjacente à camada de peptidoglicano, é constituída por uma bicamada fosfolipídica semelhante à que constitui a membrana plasmática e está ligada ao peptidoglicano por lipoproteínas. Os polissacáridos que se estendem para fora da bicamada contribuem para a toxicidade celular e a porção lipídica do LPS contém um lípido altamente tóxico, conhecido por lípido A, que é responsável pela maioria dos efeitos patogénicos associados às bactérias Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas não possuem esta membrana adicional (73, 113). O LPS, as lipoproteínas e a associação dos polissacáridos formam a chamada membrana externa (26, 73, 113).

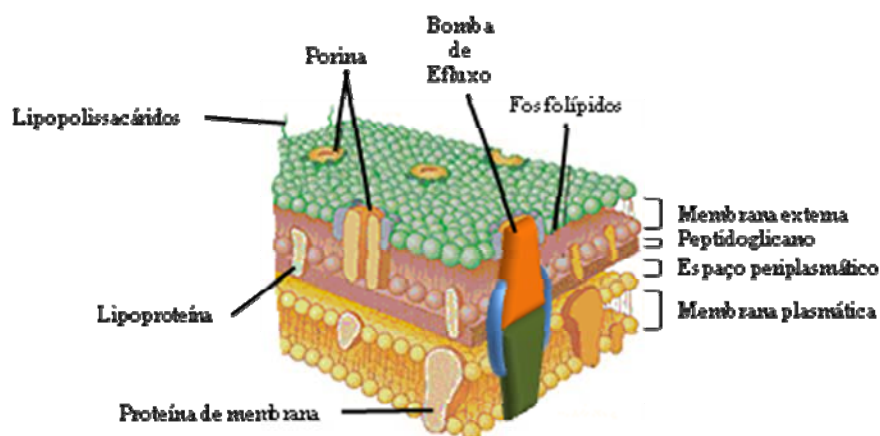


Figura 2 – Representação esquemática da parede celular de bactérias Gram-negativas (adaptado de 6).

O espaço entre a camada de peptidoglicano e a membrana externa é o espaço periplasmático, o qual contém proteínas hidrolíticas que destroem agentes exteriores e impede a sua penetração na célula (113).

A membrana externa, é uma bicamada assimétrica tendo a sua composição lipídica e proteica um forte impacto na sensibilidade das bactérias a muitos tipos de antibióticos, é comum a resistência a esses compostos pela ocorrência de modificações dessas macromoléculas (26), esta membrana tem como principal função servir de barreira protectora, prevenindo a entrada de substâncias tóxicas, tendo por isso um impacto importante sobre a susceptibilidade dos microrganismos a uma série de compostos nocivos, tais como antibióticos, desinfetantes e detergentes (26, 41, 80) não se tratando

no entanto de uma barreira impermeável. Assim, existem fluxos de substâncias para o interior e para o exterior da parede celular das *Enterobacteriaceae* mediada por proteínas específicas (81). A membrana externa é bastante mais permeável que a membrana plasmática pois permite a passagem de pequenas moléculas como glucose e outros monossacáridos para o espaço periplásmico através de porinas, que são proteínas que formam canais, os quais permitem a entrada dessas moléculas na célula (80, 113).

Em oposição, as bombas de efluxo (BE) promovem o transporte de agentes químicos indesejáveis à célula através da membrana plasmática para o exterior por canais específicos da membrana externa, o que possibilita uma diminuição da sua concentração dentro da célula (87).

Ancoradas na membrana externa encontram-se as porinas pertencentes à família das proteínas estruturais da membrana que formam trímeros de canais abertos (81), cheios de água (18, 41, 81) que permitem uma alta permeabilidade (81) através da membrana externa das bactérias Gram-negativas (16) permitindo a difusão não específica de iões e pequenas moléculas hidrofílicas (41, 80, 81). Em *E. coli* as principais porinas também designadas de proteínas de membrana externa (*Outer Membrane Proteins* (OMP)) são a OmpC e OmpF (81, 130) e em termos de massa são geralmente as proteínas mais abundantes de *E. coli* (80).

Cada célula de *E. coli* tem cerca de 100,000 cópias destas proteínas (73, 80) o que permite a difusão passiva de pequenos solutos polares através da membrana celular (16). A expressão de porinas é máxima em condições ambientais óptimas, sendo ajustada quando necessário para minimizar a penetração de compostos nocivos ou maximizar a entrada de nutrientes (80, 81, 130) não ocorrendo a difusão de compostos de grandes dimensões o que diminui drasticamente o influxo da maioria dos antibióticos que são geralmente de dimensões maiores relativamente aos nutrientes comuns (80, 140). Para além destas porinas existem também as proteínas monoméricas, tal como a OmpA de *E. coli*, que permite a difusão lenta e não específica de pequenos solutos (80, 81). O canal de porinas de *E. coli* diminui a pH ácido, ocorrendo o estreitamento do canal a pH 5.4 (81).

1.1.3. Importância clínica e terapêutica

Reconhecido como um organismo comensal, *E. coli*, é uma espécie de maior importância clínica, ocasionando frequentemente infecções intestinais, urinárias, gastroenterites, pneumonias, septicemias, abscessos, entre outras (23, 101). *E. coli* é a causa comum de diarreia em países em vias de desenvolvimento e em viajantes para esses países. É a bactéria aeróbia facultativa predominante na flora intestinal, sendo o ambiente natural de *E. coli* o tracto intestinal de humanos e animais, pertencendo ao grupo dos coliformes fecais. A sua presença é indicadora de contaminação fecal na água e nos alimentos (52, 101, 64). As infecções intestinais causam frequentemente diarreia em lactentes (52), em crianças e em imunocomprometidos, podendo causar infecções mais graves, associadas a alta morbidade e mortalidade. Para estes grupos de pacientes, a terapia antimicrobiana é necessária, devendo ser feito com cefalosporinas de largo espectro ou fluoroquinolonas (95).

1.1.4. Mecanismos de acção, e resistência

Os agentes antimicrobianos são substâncias que inibem o crescimento microbiano ou eliminam o microorganismo. Entre estes fazem parte, para além dos antibióticos (de origem natural), os compostos produzidos sinteticamente (24). A propriedade mais importante que os agentes antimicrobianos devem possuir para terem utilidade clínica, é a presença de uma toxicidade selectiva que lhes permita inibir ou eliminar o microorganismo sem ter um efeito tóxico no hospedeiro ao qual são administrados (24, 55, 136). Existe, contudo, uma má utilização dos antibióticos, nomeadamente a auto-medicação, o desconhecimento do mecanismo de acção dos antibióticos, utilização excessiva dos mesmos, aumento da quantidade destes compostos na alimentação animal, entre outros, que tem como principal consequência o aparecimento das bactérias multirresistentes difíceis de combater (118), ou seja, resistentes a três ou mais classes de antibióticos diferentes (96, 118). Deste modo, infecções que anteriormente eram facilmente controláveis passam a ser praticamente impossíveis de tratar.

Os antibióticos podem ser classificados segundo vários critérios sendo a mais comum a que usa o seu mecanismo de acção como critério de classificação (59, 118, 134): a) Inibidores da síntese da parede celular – actuam produzindo defeitos estruturais na parede interferindo no processo de replicação celular (*eg.* penicilinas e derivados); b) Inibidores da membrana celular – desorganizam a estrutura das membranas das bactérias (*eg.* polimixina); c) Inibidores da síntese de ácidos nucleicos - afectam a síntese de DNA ou RNA, ou ligam-se a estes de tal forma que a mensagem não pode ser lida pelas proteínas descodificantes (*eg.* quinolonas e rifampicinas); d) Inibidores competitivos – agentes quimioterapêuticos sintéticos que interferem com funções metabólicas na célula (*eg.* sulfamidas); e) Inibidores da síntese proteica – inibidores de etapas no processo de tradução, provocando uma paragem na síntese proteica, consequentemente no crescimento levando à eliminação da célula bacteriana (*eg.* cloranfenicol, tetraciclina e macrolídeos).

Entre os antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções a *E. coli*, os que mais são prescritos na prática clínica são, as sulfonamidas, fluoroquinolonas, ampicilina, cefalosporinas e aminoglicosídeos (15). O conjunto de antibióticos mais comum para o tratamento das infecções a *E. coli* (sobretudo as urinárias) é uma combinação de sulfonamida e trimetoprim, amoxicilina, ciprofloxacina e outras quinolonas. No entanto, a amoxicilina hoje em dia tem-se tornado ineficaz no combate às infecções urinárias, pelos padrões de resistência observados em infecções causadas por *E. coli*. Os aminoglicosídeos e as cefalosporinas são também frequentemente utilizados na prática clínica tendo sido provado que regimes terapêuticos de longa duração, são tão efectivos como os de curta duração (três dias) usando antibióticos de largo espectro (95).

A resistência aos antibióticos surge quando a bactéria se altera genética e fisiologicamente tornando os antibióticos menos efectivos ou completamente inefectivos no seu combate. Assim, a resistência ao antibiótico descreve a capacidade da bactéria para sobreviver ou se multiplicar na presença de uma concentração de antibiótico que previamente lhe seria letal, ou pelo menos que seria suficiente para inibir o seu crescimento (98).

Os principais mecanismos para a resistência das bactérias aos antibióticos são: a) alteração da molécula alvo, como por exemplo o utilizar de outro enzima pela bactéria para desempenhar a mesma função que o enzima alvo do antibiótico; b) decomposição ou inativação enzimática do antibiótico por enzimas hidrolíticas específicas; c) diminuição da capacidade de penetração do antibiótico na bactéria; d) Bombear do antibiótico para o exterior mais rapidamente do que este entra na bactéria; e) mutação espontânea e recombinação genética que criam variabilidade sobre a qual actua a selecção natural e f) aquisição de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões, bacteriófagos), que podem transportar genes que codificam determinantes de resistência (Figura 3) (39, 55, 59, 83, 118).

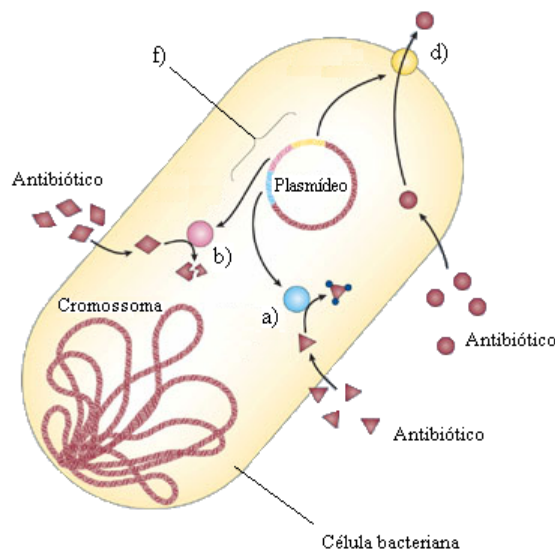


Figura 3 – Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência a antibióticos. a) alteração da molécula alvo, b) inativação enzimática do antibiótico, c) diminuição da capacidade de penetração do antibiótico, d) efluxo, e) mutações, f) aquisição de elementos genéticos móveis (adaptado de 59).

Na presença desta multiplicidade de mecanismos de resistência sabe-se hoje que a multirresistência emerge sobretudo nos casos de doentes sob antibioterapia prolongada, como por exemplo, um doente com infecções urinárias ou do trato respiratório de repetição que são sujeitos a antibioterapia repetida ao longo do tempo. O abuso do

tratamento empírico com antibióticos, muitas vezes de largo espectro, sem antes ter sido identificado o organismo e o seu perfil de resistência aos fármacos, conduz à eliminação da flora susceptível comensal e ao aparecimento de reservatórios de estirpes multirresistentes sobretudo de bactérias comensais como *E. coli*. Os factores ambientais, alimentares e o abuso de desinfectantes domésticos e outros agentes antibacterianos, também são apontados como potenciadores de multirresistência, embora sejam escassos os estudos de correlação directa entre a emergência de estirpes multirresistentes em animais, na agricultura e água, e as infecções em humanos (3). Ao se proporcionar condições para uma presença constante de concentrações sub-terapêuticas e sub-inibitórias de antibiótico numa determinada população bacteriana, esta situação irá conduzir à selecção da resistência e um dos principais mecanismos de reacção imediata à acção antibiótica é a activação dos sistemas de efluxo.

O efluxo de antibióticos só recentemente foi aceite como um possível mecanismo de resistência nas infecções bacterianas, embora já tenha sido descrito em 1978 com a descoberta de proteínas de transporte de membrana em bactérias Gram-negativas que excluem tetraciclina de *E. coli* (58). Desde então chegou-se à conclusão que este mecanismo está presente na maioria das bactérias patogénicas, sendo responsável pela sua sobrevivência na presença de determinadas concentrações de antibióticos e outras toxinas (96).

1.2. Sistemas de efluxo e sua presença em *E. coli*

As proteínas de efluxo de múltiplos agentes quimioterapêuticos são proteínas específicas de transporte para o exterior das células que se encontram codificadas nos plasmídeos ou no cromossoma bacteriano podendo ser específicas, facilitando o efluxo de exclusivamente um substrato, ou pelo contrário, transportar uma variedade de classes de substratos, como no caso da família das tetraciclina, ou podem ser não específicas quando apresentam uma grande especificidade para compostos químicos que não têm qualquer relação estrutural, estas designam-se de bombas de resistência a múltiplos compostos (MDR, do inglês “Multi Drug Resistance”) (21, 96).

Verificou-se que existem BE tanto em procariontes como em eucariontes, sendo que a primeira observação do efluxo de agentes quimioterapêuticos em eucariontes se refere ao aparecimento de resistência a citostáticos em linhas celulares neoplásicas com P-glicoproteína. Algumas das BE não são apenas responsáveis pela extrusão de agentes quimioterapêuticos mas também compostos como a hemolisina em *E. coli* (38), ou esteróides como a progesterona e o cortisol ou ainda exportar adesinas, toxinas e outras proteínas importantes para a colonização e infecção de células humanas e animais (30). O efluxo está envolvido na baixa susceptibilidade intrínseca, resistência cruzada a moléculas de classes químicas não relacionadas, e selecção / aquisição de mecanismos de resistência adicionais (65).

Com base no critério bioenergético e estrutural, as BE podem ser catalogadas em duas grandes classes: os transportadores activos primários pertencentes à superfamília ABC (do inglês, “Adenosine Triphosphate (ATP)-binding cassette”), que usam a energia da hidrólise do ATP; e os que utilizam o gradiente transmembranar electroquímico de protões e sódio, para transportar os antibióticos para fora da célula, constituindo os sistemas de transporte secundários (87, 95, 98).

Os transportadores da classe dos transportadores activos secundários englobam quatro famílias fundamentais de BE e a sua caracterização estrutural e bioquímica depende do número de regiões transmembranares proteicas, número de componentes da bomba, da fonte de energia utilizada e do tipo de substratos que a bomba exporta (61, 106). Assim temos:

- Superfamília “major facilitator” (MFS).
- Família “multidrug and toxic compound extrusion” (MATE).
- Família “small multidrug resistance” (SMR).
- Superfamília “resistance nodulation division” (RND).

As BE podem também classificar-se como sistemas multicomponentes ou sistemas constituídos apenas por um componente. Os sistemas multicomponentes, existentes em bactérias Gram-negativas, são constituídos por uma proteína membranar de fusão MFP

(do inglês, "Membrane Fusion Protein"), uma proteína membrana externa OMP (do inglês, "Outer Membrane Protein") e uma proteína transportadora (53, 55). Estas bombas permitem o transporte dos compostos para o espaço extracelular através da parede celular. No caso das BE com apenas um componente, presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, os compostos são transportados apenas através da membrana plasmática, sendo eliminados para o meio extracelular no caso das bactérias Gram-positivas, ou para o espaço periplasmático no caso das bactérias Gram-negativas (53).

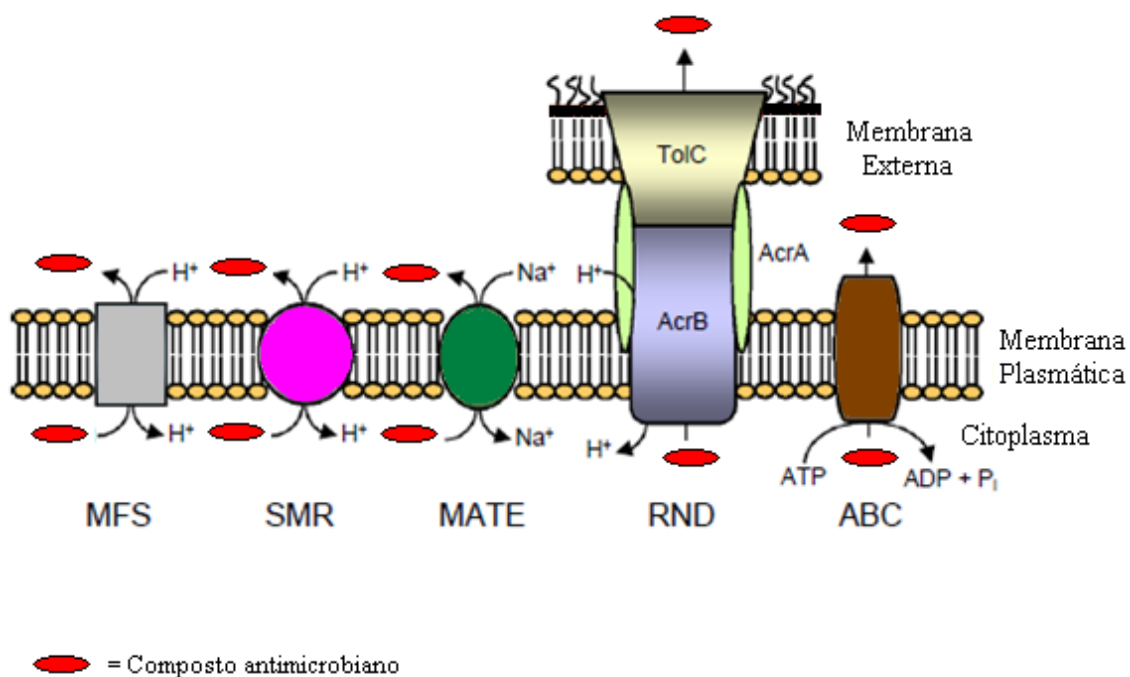


Figura 4 – Representação esquemática e simplificada das cinco famílias de bombas de efluxo bacterianas (MFS, SMR, MATE, RND, ABC) (adaptado de 53). Legenda: ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; P_i : fosfato inorgânico.

1.2.1. Superfamília "ATP-binding cassette" (ABC)

Os transportadores da classe "ATP-binding cassette superfamily" (ABC), são complexos multi-proteicos (formando um canal de transporte pela membrana citoplasmática) e proteínas citoplasmáticas com actividade de ATPases, utilizando a energia da hidrólise do ATP para transportar através de membranas biológicas uma

variedade de substratos que incluem açúcares, aminoácidos, iões, antibióticos, proteínas e polissacáridos, e estão envolvidos no efluxo de toxinas, metabolitos e agentes quimioterapêuticos (9, 10, 104) (Figura 4). Um dos transportadores ABC mais bem estudados é a P- glicoproteína dos mamíferos (P-gp, MDR1), cuja sobre-expressão confere resistência aos compostos citotóxicos usados na quimioterapia (97, 112). Em *E. coli*, um representante desta superfamília é o transportador de macrólidos MacB (10).

1.2.2. Superfamília "Major Facilitator" (MFS)

A superfamília “major facilitator” (MFS) (Figura 4) compreende mais de 300 proteínas, que se encontram agrupadas em, pelo menos, 17 famílias (104). Estes transportadores estão presentes tanto em eucariontes como em procariontes, sendo responsáveis por resistência a compostos antimicrobianos, pela entrada na célula de açúcares, intermediários do ciclo de Krebs e oligossacáridos, assim como pela realização do antiporte e simporte de diversos compostos (90, 104). De entre os sistemas de efluxo de compostos antimicrobianos mais estudados desta superfamília fazem parte EmrAB-TolC de *E. coli*, QacA/B e NorA de *Staphylococcus aureus* (53, 83).

1.2.3. Família "Multidrug and Toxic Compound Extrusion" (MATE)

As proteínas pertencentes a esta família têm uma topologia membranar semelhante às proteínas da superfamília MFS, embora as suas sequências não sejam homólogas. Foram encontradas duas fontes de energia para as BE da família MATE (Figura 4), a força proto-motriz (FPM) e o gradiente de sódio transmembranar, estando o efluxo de compostos associado com o influxo de sódio. A família de transportadores MATE é a mais recentemente descrita e por isso a menos bem caracterizada, no entanto esta situação está a mudar rapidamente, pois esta família tem um papel importante na resistência a antibióticos em organismos patogénicos clinicamente relevantes (53). Desta família fazem parte as BE YdhE de *E. coli*, MepA de *S. aureus*, e NorM de *Neisseria meningitidis* (98).

1.2.4. Família "Small Multidrug Resistance" (SMR)

Esta família é composta pelas mais pequenas proteínas de transporte membranar conhecidas (83), sendo energizadas pela FPM (104). A família SMR (Figura 4) consiste em duas subfamílias filogenéticas. Membros de uma subfamília conferem MDR e catalizam o efluxo de compostos através de um mecanismo de antiporte, no entanto membros de outra subfamília aparentemente não conferem resistência nem catalisam um mecanismo de antiporte. São parte integrante desta família os transportadores de efluxo EmrE de *E. coli*, e Smr de *S. aureus*, os quais efluxam corantes, antibióticos e catiões (53). O EmrE de *E. coli* é um transportador de múltiplos compostos que contribui para a resistência ao brometo de etídeo (83).

1.2.5. Superfamília "Resistance Nodulation Division" (RND)

Embora existam representantes de todas as famílias, as BE encontradas com maior frequência em bactérias Gram-negativas pertencem à superfamília RND (Figura 4) (53, 98). Estas possuem uma estrutura tripartida composta pela MFP, localizada no espaço periplasmático, a OMP, embebida na membrana externa e, na membrana citoplasmática, encontra-se a proteína transportadora. Os genes que codificam as bombas da família RND localizam-se geralmente no cromossoma, embora tenha já sido identificada a sua presença em plasmídeos. Os sistemas de efluxo RND transportam vários substratos, por antiporte substrato / H^+ , conferindo multirresistência (83).

Em *E. coli* foram já identificados e caracterizados sistemas de efluxo da família RND, dos quais são exemplo AcrAB, AcrEF, AcrD, YhiUV e MdtABC. A actividade das bombas AcrEF, YhiUV e MdtABC não resulta num aumento significativo da resistência aos antibióticos, embora a sua sobre-expressão em estirpes mutantes se traduza em resistência a alguns compostos como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e eritromicina, respectivamente. AcrD, associada às proteínas AcrA e TolC, está relacionada com o efluxo de aminoglicosídeos, novobiocina e sais biliares (53). A bomba AcrAB-TolC (Figura 4) é a que representa maior expressão em *E. coli*, estando associada ao efluxo de uma grande variedade de substratos, onde se incluem várias

classes de antibióticos, brometo de etídeo (EtBr), ácidos gordos e solventes orgânicos (83).

O sistema de efluxo AcrAB-TolC apresenta na sua estrutura a MFP AcrA, que é uma proteína “adaptadora” periplásmica, a proteína transportadora AcrB e a OMP TolC (29, 74, 83). A proteína AcrB transporta diferentes substratos, dos quais são exemplo solventes orgânicos, corantes, catiões hidrofóbicos como o EtBr (106), detergentes e antibióticos (29). O transporte destes últimos é responsável, ainda que associado a outros mecanismos, pelo fenótipo de multirresistência de estirpes de *E. coli* (29, 95).

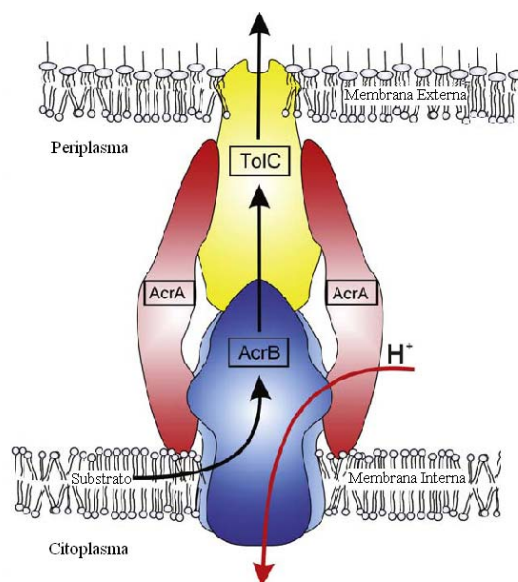


Figura 5 – Representação esquemática do sistema de efluxo tripartido AcrAB-TolC de *E. coli*
(adaptado de 99).

A proteína AcrB apresenta uma estrutura típica das proteínas transportadoras da família RND, mencionada acima. Esta estrutura foi determinada por cristalografia de raios-X a 3.5 Å, revelando um trímero composto por uma região transmembranar e uma protuberância que se estende ao citoplasma (29, 74). A sua parte superior apresenta-se aberta, de forma semelhante a um funil, e ligada por um poro ao domínio inferior, que se abre numa cavidade central na superfície da membrana. Na cavidade central foi revelada, através de estudos de co-cristalização, a ligação de substratos com estruturas

distintas. A presença no local de ligação de uma componente lipídica e de uma componente proteica, poderá explicar essa diversidade de substratos (91, 140).

A estrutura da proteína AcrB apresenta também três aberturas (vestíbulos) ao nível da superfície externa da membrana plasmática. Estes vestíbulos, ligados à cavidade existente no centro do trímero, supõem-se envolvidos no transporte de substratos a partir do citoplasma ou do folheto externo da membrana citoplasmática (29, 74). A apoiar esta hipótese está o transporte por parte do sistema AcrAB-TolC, de substratos que não atravessam a membrana citoplasmática, tais como os compostos β -lactâmicos (140).

A ligação a AcrA e a TolC da proteína AcrB, permite o transporte de substratos num mecanismo que envolve a interacção da parte superior, em forma de funil, desta proteína com a parte inferior de TolC. Por outro lado, AcrA estará envolvido na estabilização da ligação entre AcrB e TolC. A remoção de substratos, quer do citoplasma, quer do espaço periplasmático, envolve ainda alterações conformacionais de AcrA e AcrB. Estas proteínas, permanentemente ligadas, alteram a sua conformação por ligação aos substratos, de forma a estabelecer a ligação a TolC. Esta OMP fará então a condução dos substratos para o espaço extracelular, a partir da cavidade central (55).

A função da BE AcrAB-TolC, assim como a dos restantes sistemas de efluxo, ainda não está totalmente esclarecida, mas sabe-se estar relacionada com a adaptação a ambientes desfavoráveis, sendo disso exemplo o transporte de sais biliares, presentes a nível intestinal, pelo sistema AcrAB-TolC de *E. coli* (53). A multirresistência por efluxo através da bomba AcrAB-TolC, envolve antibióticos como β -lactâmicos lipofílicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, ácido nalidíxico, rifampicina, macrólidos e cloranfenicol (53, 95, 98).

A junção dos dois mecanismos, efluxo e diminuição de permeabilidade, contribui para níveis elevados de resistência (53, 130).

Em *E. coli* foram identificadas 30 BE (84, 104; 126). As bombas melhor estudadas em *E. coli* são transportadores primários da superfamília ABC, as quais são sobretudo transportadores de açúcares e outros nutrientes (97), sendo que nove transportadores secundários foram descritos como sendo capazes de bombear múltiplos substratos para

o meio extracelular, quando expressos em níveis elevados. Os mais importantes são a EmrD, MdfA e EmrB pertencentes à superfamília MFS; a AcrB, AcrD, AcrF e YhiV que pertencem à família RND e a EmrE e a TehA que são membros da família SMR (7, 60, 84, 125, 126).

Como anteriormente referido a resistência por acção de BE, constitui uma das causas de resistência encontradas nos isolados clínicos, sendo caso paradigmático a sobre expressão de BE da família RND em *Enterobacteriaceae* (83). Por este motivo, torna-se essencial o estudo mais aprofundado destas BE, da sua estrutura e substratos, e em particular neste trabalho procuramos compreender as suas condicionantes bioenergéticas, de forma a ser possível no futuro testar novas moléculas que possam vir a constituir novos antibióticos e/ou compostos que ajudem a restabelecer a eficácia dos antibióticos usados na prática clínica. Tem-se realizado muitos estudos *in vitro*, onde se utilizam compostos designados como inibidores de bombas de efluxo (IBEs), que actuam bloqueando o efluxo e desta forma conduzem a uma redução da concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos para os isolados clínicos MDR em laboratório. Vários compostos não antibióticos têm sido utilizados no sentido de se obter uma reversão ou diminuição da resistência aos antibióticos. Os efeitos desejados do uso dos IBEs são: a) diminuição da resistência intrínseca da bactéria aos antibióticos; b) reversão da resistência adquirida mesmo em estirpes altamente resistentes com múltiplos alvos e c) reduzir a frequência da emergência de estirpes mutantes (66).

Embora sejam compostos com eficácia comprovada *in vitro*, ainda apresentam grandes limitações à sua transposição para a prática terapêutica pois, na sua grande maioria, desconhece-se o seu mecanismo de acção e muitos são tóxicos para o hospedeiro nas concentrações usadas *in vitro*.

Embora estes compostos revelem capacidade de diminuir a CMI *in vitro* de muitos antibióticos, através de uma actuação sinérgica com estes, tem-se vindo a verificar que os IBEs descritos até à data não têm uma actividade inibitória específica sobre uma ou mais bombas. Ao invés os IBEs actuam segundo um de dois possíveis modos de acção: a) como inibidores competitivos dos substratos da bomba, como é o caso do P β AN (*L-Phe-L-Arg- β -naphthylamide*) ao inibir bombas RND de *Enterobacteriaceae* (63, 67); ou b) como depletor da energia para o efluxo activo, seja ele baseado na energia vinda

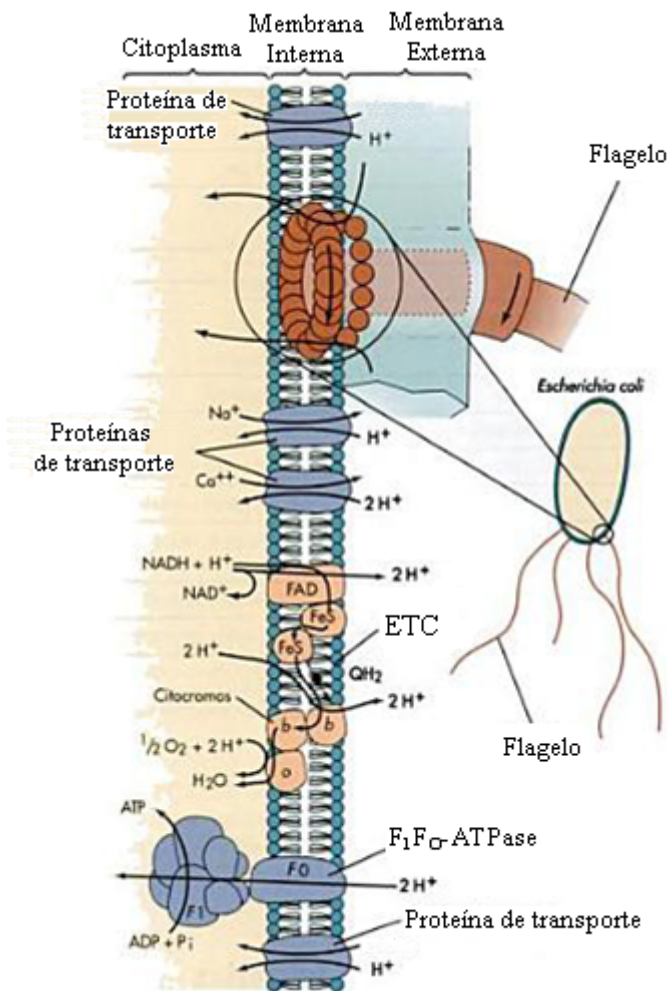
da diferença de potencial protónico ou FPM, típica da acção do CCCP sobre as bombas RND das *Enterobacteriaceae*, ou baseado na hidrólise do ATP, como é típico de inibidores como a reserpina sobre bombas ABC (66, 88).

Assim, é objecto de estudo neste trabalho a relação entre as vias produtoras de energia para o transporte de substratos em *E. coli* (o nosso modelo de estudo), o efluxo de antibióticos e o estudo de compostos inibidores de actividades celulares produtoras de energia para o transporte como potenciais IBEs. Para este fim há que compreender as duas principais fontes de energia metabólica para o transporte celular, a energia proveniente da hidrólise do ATP e a energia proveniente da FPM, e sobretudo a forma como estas duas fontes de energia metabólica se interligam e cooperam para manter as actividades de transporte celular.

1.3. Bioenergética bacteriana

Um dos principais objectivos de qualquer ser vivo é a obtenção de energia para a sua sobrevivência. De acordo com a teoria heterotrófica, os primeiros seres vivos seriam procariotas heterotróficos que viviam em meio aquático, donde retiravam os nutrientes que eram formados na atmosfera e acumulados nos lagos e oceanos primitivos. Devido à sua simplicidade, estes seres vivos utilizavam processos rudimentares para retirar energia dessas moléculas. Esse mecanismo seria semelhante à fermentação actual e apenas há 2 mil milhões de anos, terão surgido os primeiros organismos autotróficos, procariotas capazes de produzir a sua própria energia através da fotossíntese. Este processo revolucionário, a fotossíntese, além de permitir a sobrevivência dos seres autotróficos, também serviu de base à sobrevivência dos seres heterotróficos, que passaram a alimentar-se dos primeiros, bem como levou à acumulação de oxigénio na atmosfera terrestre, permitindo a alguns procariotas usar o poder oxidante dessa molécula para retirar mais energia dos nutrientes, através da respiração aeróbia (64).

Assim, os organismos heterotróficos aeróbios como *E. coli* retiram energia das mais diversas moléculas orgânicas (açúcares, aminoácidos, ácidos gordos, etc.) através de um processo de catabolismo que se inicia na glucose, processo que ocorre em praticamente todos os seres vivos, denominado de glicólise, também designado por via de Embden-Meyerhof-Parnas, mesmo que complementada com outras reacções, o que parece confirmar que deverá ter sido o primeiro fenómeno eficiente de produção de energia em células (64, 75). A glicólise ocorre no citoplasma e consiste na degradação da glucose em ácido pirúvico, é designada a fase anaeróbia da respiração pois é exactamente igual ao processo que decorre na fermentação, ao que se segue a descarboxilação oxidativa pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou ciclo de Krebs. Por fim a cadeia respiratória ou cadeia transportadora de electrões consiste na transferência dos electrões, libertados



durante a oxidação da glucose, para o oxigénio, aceitador final destes electrões, o qual fica carregado negativamente e combina-se com os protões em solução, originando água. Esta transferência para além de formar água, liberta energia, que é capturada ao nível dos citocromos através do processo de fosforilação oxidativa que gera ATP por acção da enzima F_1F_0 -ATPase (31, 62, 64, 75). Deste modo, a energia disponível na célula que garante a sua sobrevivência que, para o objectivo deste trabalho, garante a energia necessária para o transporte de substratos, é gerada, armazenada e disponibilizada através desta enzima essencial à bioenergética celular.

Figura 6 – Representação da membrana citoplasmática de *E. coli* com a maquinaria necessária à produção de ATP [cadeia de transporte electrónico (ETC), citocromos, F-ATPase] e potencial de membrana ($\Delta\Psi$). O $\Delta\Psi$ fornece a energia electroquímica para as proteínas de transporte e para o movimento flagelar (adaptado de 75).

1.3.1. ATPases, gradiente electroquímico de protões e força proto-motriz (FPM)

As conversões energéticas são comuns a todas as formas de vida. A degradação de nutrientes em animais ou bactérias ou a fotossíntese em plantas, culmina com a produção de ATP, a molécula universal de transferência de energia (27) que suporta quase todas as actividades celulares que requerem energia. O ATP é a fonte de energia primária para o transporte de solutos e macromoléculas através de membranas citoplasmáticas (97). A síntese de ATP é uma das principais reacções químicas no mundo biológico (139).

ATPases ou estruturas semelhantes são encontradas em todos os organismos que sintetizam ou hidrolisam ATP acoplado com a translocação de protões (14). Existem diferentes tipos de ATPases, as quais podem diferir na estrutura, no tipo de iões que transportam e na função (síntese e/ou hidrólise de ATP). As ATPases podem ser agrupadas em quatro tipos distintos, P, F, V e ABC, com as três primeiras designadas há mais de 20 anos atrás e as do tipo ABC (vide secção 1.2.1.) descritas mais recentemente. Estes quatro tipos têm em comum o facto de existirem inseridas e transportarem pelo menos um átomo ou molécula através de membranas biológicas acoplado com a hidrólise de ATP. De facto, são nano-máquinas (tipo P e ABC) ou duplas nano-máquinas (tipo F e V) (Figura 7) (93).

As F_1F_0 -ATPases estão presentes nas membranas de bactérias, mitocôndrias e cloroplastos (17, 27, 33), e as V_1V_0 -ATPases (ATPases vacuolares) presentes em vacuolos intracelulares de células eucariotas (25, 33, 93), em vesículas intracelulares de leveduras, plantas e animais (25). Assim, as ATPases estão presentes em todos os domínios da vida, tendo surgido de um ancestral comum, mas evoluíram em classes distintas de ATP sintetases/ATPases (33). Todas as ATPases, incluindo as de mitocôndria e cloroplastos, partilham similaridades mecânicas e estruturais (25). A distribuição tão abrangente das F_1F_0 -ATPases em mitocôndrias e cloroplastos dos eucariotas e nas membranas celulares de eubactérias demonstra a sua grande importância.

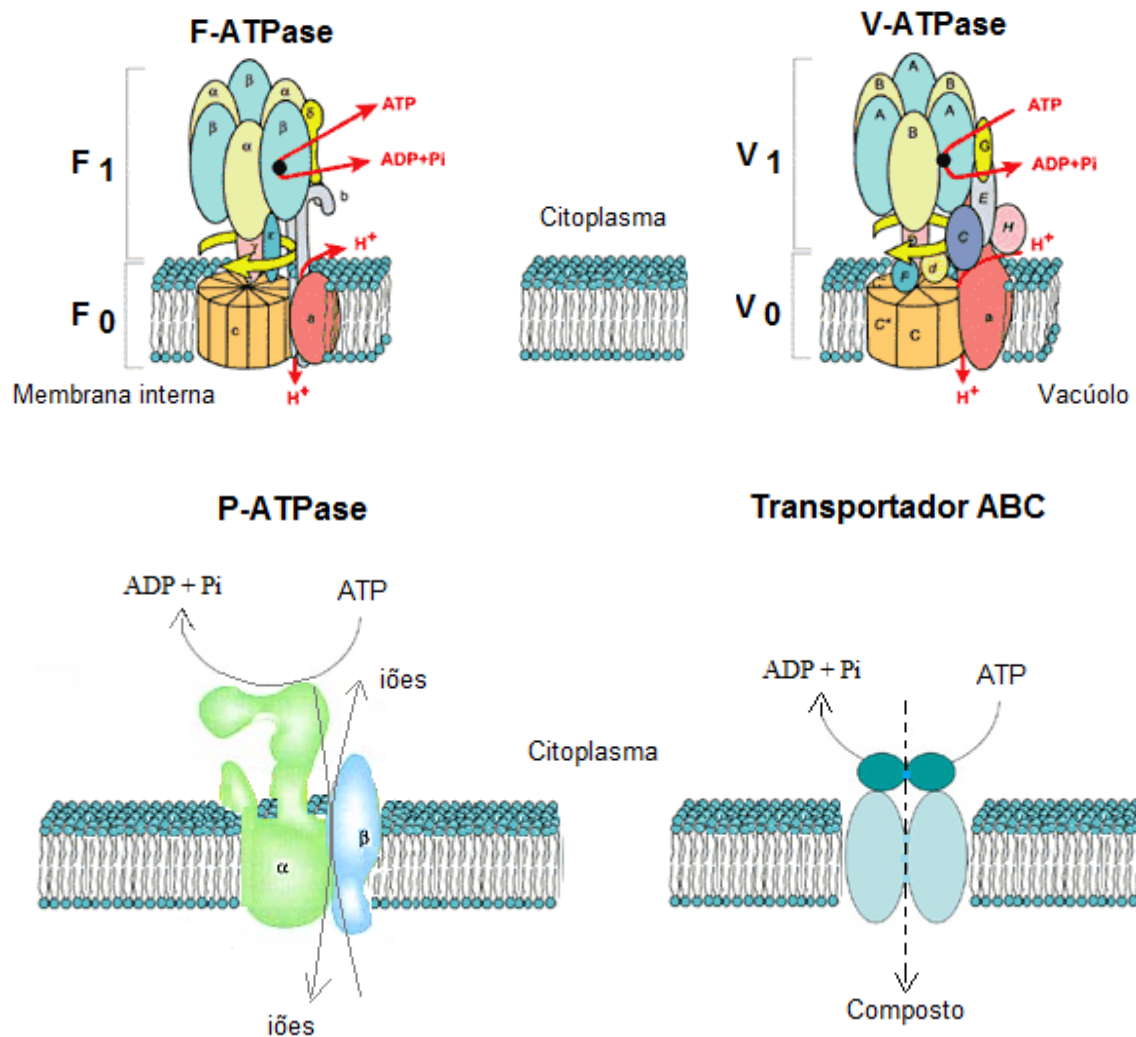


Figura 7 - Estrutura das ATPases de transporte.

F-ATPase e V-ATPase (adaptado de 79); P-ATPase e Transportador ABC (adaptado de Functional Membrane Proteomics, site: <http://www.sfb628.uni-frankfurt.de/> acedido em Agosto de 2010).

Assim, as F_1F_0 -ATPases (Número EC 3.6.1.34) (também denominada de F_1F_0 -ATP sintetase, ATP sintetase, F-ATPase ou simplesmente ATPase) de bactérias têm duas importantes funções fisiológicas (25):

i) usam um gradiente protónico ($\Delta\mu_H^+$) e o potencial de membrana ($\Delta\psi$) associado para sintetizar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (P_i) na etapa final da fosforilação oxidativa (17, 46),

ii) podem reverter a sua acção funcionando como ATPase para catalisar a hidrólise de ATP (17) quando necessário para gerar um gradiente electroquímico transmembranar de protões requerido para a locomoção, consumo de nutrientes e outras funções (135).

As F-ATPases consomem um gradiente electroquímico de protões (H^+) para sintetizar ATP, ou hidrolisam ATP para construir um gradiente de H^+ . As V-ATPases constroem um gradiente de H^+ através da membrana catalisando a hidrólise de ATP para transportar solutos e baixar o pH no interior dos organelos, não funcionando em condições fisiológicas de forma reversível (42).

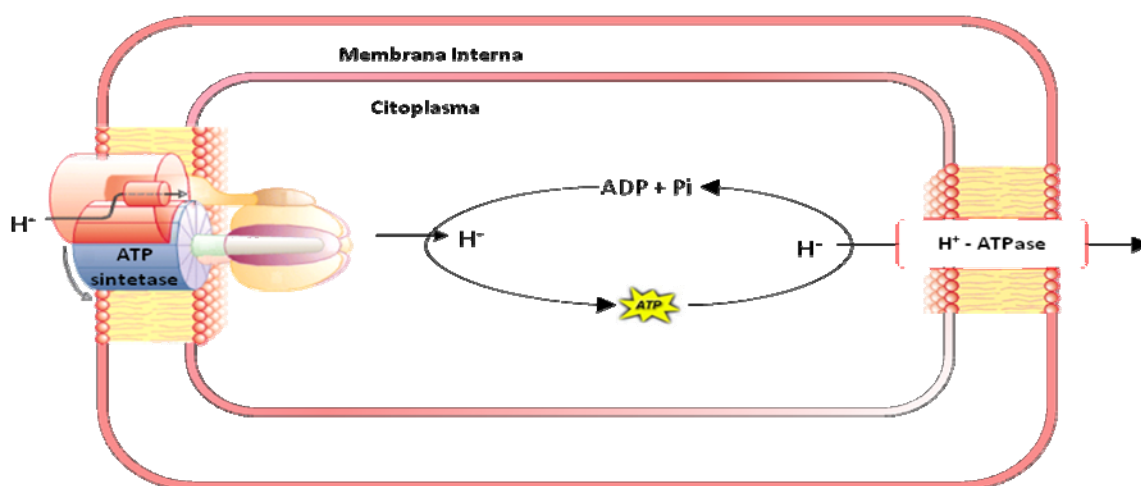


Figura 8 – Representação esquemática da função fisiológica da F-ATPase (adaptado de 62).

Neste trabalho, dedicamos especial atenção às ATPases do tipo F. A F_1F_0 -ATPase é a enzima chave na interconversão energética celular (17). A enzima é composta por dois domínios estrutural e funcionalmente distintos:

- i) o domínio F_0 (também denominado F_0 -ATPase) hidrofóbico, intrínseco na membrana, o qual está envolvido na translocação de protões através da membrana;
- ii) o domínio hidrofílico, extrínseco/periférico F_1 (também denominado F_1 -ATPase) que contém os locais catalíticos para a síntese e hidrólise de ATP (25, 42, 47, 51, 115).

Por outro lado, F_1 e F_0 estão ligados por um veio central e um veio periférico (27). Quando F_1 e F_0 estão acoplados através de interações hidrofóbicas e electroestáticas, o complexo F_1F_0 pode funcionar como ATPase ou como ATP sintetase (25). Os domínios F_1 e F_0 podem funcionar separadamente, no entanto, a síntese de ATP requer que as subunidades F_1 e F_0 estejam ligadas (14, 17).

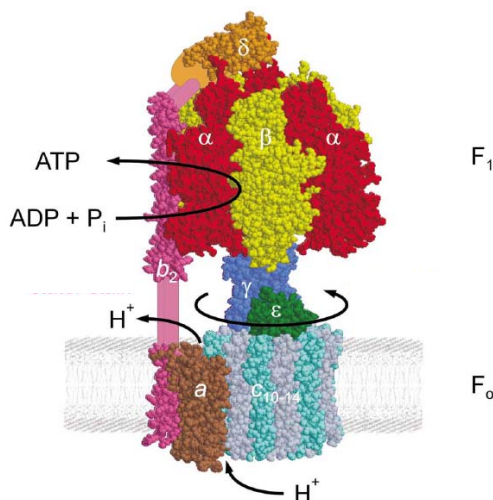


Figura 9 - Estrutura da F_1F_0 -ATPase de *E. coli* (adaptado de 135).

A F_1F_0 -ATPase usa a rotação física das suas próprias sub-unidades como um passo da catálise – um mecanismo diferente dos de qualquer outra enzima conhecida, pois a rotação não é um mecanismo celular preferencial (139).

É possível definir a F_1F_0 -ATPase como um sistema que funciona como um complexo de dois motores rotacionais acoplados (Figura 9) (33, 139); um no domínio F_1 , que executa a tarefa de síntese e hidrólise de ATP (51) com os movimentos de um rotor interno, e outro no domínio F_0 , que liga a translocação de protões com os movimentos deste rotor F_0 (17). Cada um destes domínios funciona como um motor rotacional reversível, com direcções de rotação opostas (139) e trocam energia com o motor oposto através de rotação mecânica do veio central (27).

Quando F_1 é separado de F_0 , é consequentemente dissociado da geração de FPM (51), passando F_1 apenas a catalisar a hidrólise de ATP (25, 51, 139). A parte F_0 mantém-se intercalada na membrana e, na ausência de F_1 , mantém intacta a função de translocação

de prótons através da membrana, no entanto esta translocação passa a ser passiva e bidireccional (17, 25, 46, 51, 139).

O complexo F_1F_0 -ATPase tem 8 subunidades diferentes em procariotas e 16-18 subunidades em mamíferos, com um peso molecular de 550-650 KDa. A composição mínima de subunidades de F_1F_0 é representada pela F_1F_0 -ATPase de *E. coli* (Figura 9). Consiste em oito diferentes subunidades, cinco das quais pertencem à F_1 -ATPase designadamente, em ordem decrescente de tamanho e número de subunidades, $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, com uma massa molecular de ~382 kDa, e três subunidades pertencentes à F_0 -ATPase, com uma estequiometria de ab_2c_{10} e com uma massa molecular de ~148 kDa (17, 25, 34, 46).

A região do veio central é composta por subunidades de ambos os domínios F_1 e F_0 . A F_0 -ATPase em organismos superiores é consideravelmente mais complexa (14). Em *E. coli*, o movimento de prótons através de F_0 leva à rotação da subunidade oligomérica c relativamente à subunidade a , com a qual forma uma interface. Simultaneamente a rotação da subunidade alongada e assimétrica γ leva a mudanças conformacionais nos locais de ligação a nucleótidos de F_1 que são necessários para a síntese de ATP. Na ausência de um gradiente de prótons, a hidrólise de ATP levará à translocação de prótons. As subunidades a e c , são duas proteínas hidrofóbicas membranares que estão directamente envolvidas na translocação de prótons, sendo a subunidade c um anel com dez monómeros com uma cavidade central preenchida com lipídios (47). F_1 e F_0 são então interligados por dois veios, um deles central que contém as subunidades γ e ϵ , e outro periférico envolvendo as subunidades δ e b (17).

Um segundo grupo de ATPases a que se dedica especial atenção neste trabalho é o das P-ATPases bacterianas ou bombas iónicas que translocam prótons por troca com iões sódio, potássio ou cálcio (Figura 7). As P-ATPases (anteriormente denominadas E_1E_2 -ATPases) encontram-se em bactérias, fungos e na membrana plasmática e organelos de eucariotas, estando envolvidas no transporte de formas catiónicas de cálcio, sódio, potássio, cobre, e outros metais através de membranas biológicas, seguindo um ciclo de reacção que envolve um intermediário fosforilado (93). Embora se dividam em sub-classes ou sub-tipos, dependendo se translocam metais pesados ou iões sódio-potássio-

cálcio, têm estruturas e mecanismos de acção semelhantes. O conhecimento sobre a estrutura e função das P-ATPases assenta no modelo canónico da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoendoplasmático do músculo dos mamíferos. É geralmente reconhecida que a estrutura desta ATPase, é representativa da família de ATPases tipo P. Esta ATPase é composta de uma secção no citoplasma e uma secção transmembranar com dois locais de ligação ao Ca^{2+} (Figura 10). A secção citoplasmática é constituída por três domínios citoplasmáticos, denominados domínios P, N e A, contendo mais de metade da massa da proteína e cerca de dez hélices transmembranares (M1-M10), com os dois locais de ligação de Ca^{2+} perto do ponto médio da bicamada lipídica. É ao longo destas secções citoplasmáticas que ocorre a fosforilação e a translocação iónica associada (43). Crê-se que parte da energia que circula ao nível da membrana plasmática bacteriana, garantindo o potencial protónico e a FPM que fica acessível às BE bacterianas, recebe importantes contributos das P-ATPases e do transporte iónico em parceria com as F-ATPases e o transporte protónico, as principais ATPases bacterianas (138).

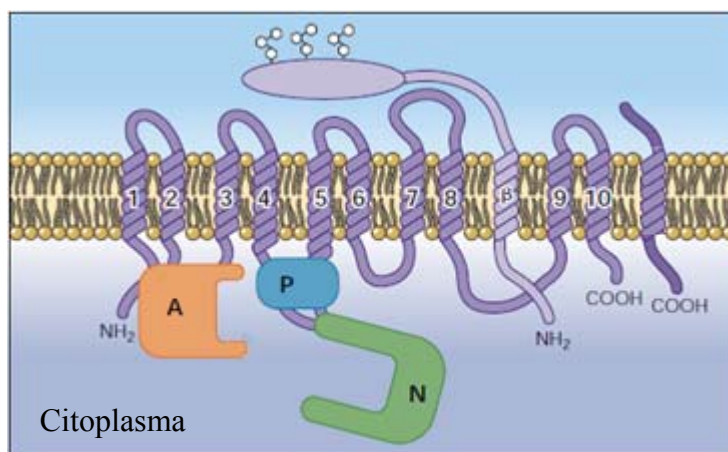


Figura 10 – Características gerais da estrutura da P-ATPase (adaptado de 43).

As F-ATPases transportam protões ajudando a estabelecer um gradiente electroquímico transmembranar. Em determinadas condições, este processo pode funcionar em sentido oposto, com a ATPase a ser movida pela FPM e a passar a funcionar como uma ATPsintetase. O ATP é sintetizado a partir da energia obtida da translocação de protões ou iões. Esta ligação de reacções endergónicas e exergónicas nas subunidades das ATPases denomina-se de acoplamento. Quando deixa de haver interacção entre as

subunidades (F_1 e F_0 nas F-ATPases), a transdução de energia é perdida, e o sistema diz-se estar desacoplado (17).

A FPM criada pelo gradiente protónico transmembranar ($\Delta\mu_H^+$) é o potencial energético que pode ser obtido pela passagem de protões através da membrana citoplasmática celular, ou seja, é um gradiente electroquímico transmembranar com dois componentes: um gradiente de protões (na forma de hidrogeniões H^+) que promove uma diferença de pH (ΔpH) e uma diferença na carga iónica ou potencial de membrana ($\Delta\psi$) devido à distribuição desigual de cargas (15, 92). Estes dois parâmetros actuam, em geral, em sentidos opostos, permitindo que a FPM se mantenha constante (102). Em bactérias metabolicamente activas com membranas citoplasmáticas intactas, a diferença de potencial ($\Delta\psi$) situa-se geralmente entre -100 mV e -200 mV, encontrando-se o interior da membrana carregado negativamente (109).

O mecanismo pelo qual a ATPase cataliza o acoplamento de energia eficiente e reversível entre o transporte vectorial de iões e substratos através da membrana e as reacções químicas da síntese e hidrólise de ATP tem sido um dos maiores pontos de interesse na investigação em bioenergética bacteriana (46). Para o efeito tem-se vindo a utilizar compostos que fazem o desacoplamento entre a FPM e a actividade da ATPase de forma a ser possível estudar a sua dinâmica, estrutura e factores condicionantes da actividade geradora de energia para o transporte de substratos através da parede e membranas bacterianas.

1.3.2. Desacopladores

Protonofóros ou agentes despolarizantes (94), tal como o CCCP (carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona) ou o 2,4-DNP (2,4-dinitrofenol), dissipam a FPM através da membrana plasmática de *E. coli* (49), sendo o CCCP 10-100 vezes mais efectivo que o 2,4-DNP (28).

Em células eucariotas, a principal acção dos protonóforos é colapsar o gradiente protónico através da membrana interna da mitocôndria ao permitir rearranjos e translocações transientes dos protões existentes à superfície interna e externa da bicamada lipídica das membranas mitocondriais, levando ao colapso do gradiente protónico transmembranar ($\Delta\mu_{\text{H}}^+$), o que resulta na anulação completa do potencial de membrana e na acumulação de iões cálcio. Os protonóforos, causam uma rápida perda de ATP, através da inibição da sua síntese e activação da sua hidrólise pela ATP sintetase mitocondrial (123). O resultado final é que o CCCP ao tornar a membrana permeável a iões H^+ , colapsa completamente o gradiente de H^+ e o gradiente de potencial através das membranas mitocondriais, bloqueando desse modo a síntese de ATP, havendo uma libertação concomitante de iões cálcio e uma estimulação da ATPase mitocondrial produzindo-se assim um declínio extremamente rápido nos níveis de ATP celulares (28).

Em células de *E. coli* em aerobiose, o $\Delta\mu_{\text{H}}^+$ é completamente anulado pelo CCCP, e resulta principalmente do efluxo de protões acoplado à oxidação de substratos (54). A despolarização causada pelo CCCP é dependente da concentração, limitando com isso o seu potencial de acção (28).

Assim, o CCCP e o 2,4-DNP, são desacopladores directos da FPM e indirectos da fosforilação oxidativa, sendo capazes de transportar protões através de membranas biológicas, que habitualmente têm baixa condutividade protónica (36).

O 2,4-DNP é usado na produção de pesticidas, de corantes, fotoquímicos, explosivos e como indicador para a detecção de iões potássio e amónio. É também usado na produção de 2,4-diaminofenol o qual é usado no tratamento médico da obesidade (108).

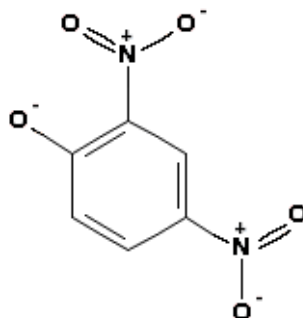


Figura 11 – Estrutura química do composto 2,4-dinitrofenol ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_5^-$) (adaptado de 77).

O CCCP é um ácido orgânico fraco, lipofílico (70, 132) que inibe o gradiente protónico, ou seja inibe a FPM (19), actuado como um transportador e atractor protónico e como desacoplador (70, 132).

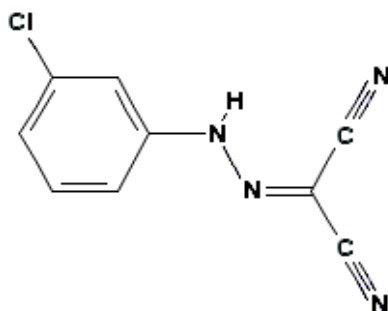


Figura 12 – Estrutura química do composto CCCP ($C_9H_5ClN_4$) (adaptado de 77).

1.3.2.1. Mecanismo de acção / Efeito bioenergético do CCCP

Em estado estacionário, o nível celular de ATP em células viáveis é determinado pelas taxas de síntese e hidrólise de ATP. A maioria da síntese celular de ATP está associada ao processo de transferência de electrões na membrana. O transporte de protões na membrana serve como factor intermediário essencial para ocorrer a transferência de electrões relacionada com a síntese de ATP (72) e o transporte de solutos dependentes de energia. As células utilizam a energia proveniente da hidrólise de ATP pelas ATPases membranares para manter a concentração interna de iões, e de pequenos metabolitos através dos sistemas de transporte membranar. Sendo um protonóforo membranar, o CCCP tem a capacidade para colapsar o gradiente protónico necessário para assegurar a síntese de ATP e o transporte membranar. Consequentemente a sua presença diminui a síntese de ATP, pela diminuição do gradiente protónico transmembranar ($\Delta\mu_H^+$) e aumenta a utilização de ATP pois as células são forçadas a hidrolisar mais ATP para restabelecer o potencial protónico (92, 124). A acção do CCCP e os seus efeitos bioenergéticos estão ilustrados na Figura 13.

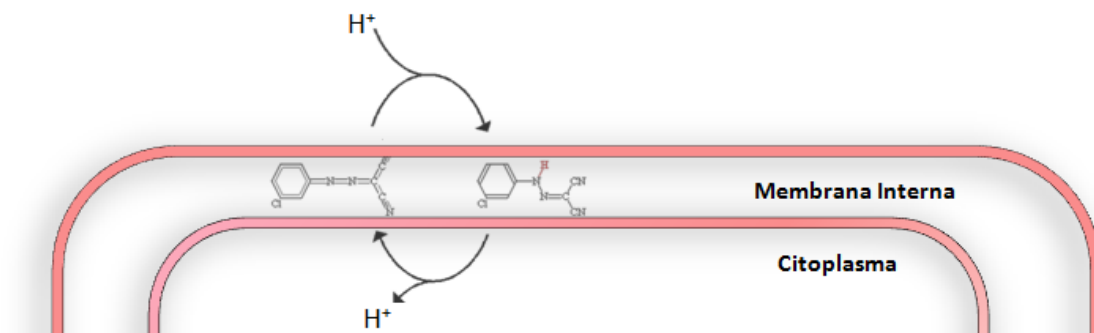


Figura 13 - Efeito bioenergético dos protonóforos (adaptado de 124).

Em células viáveis, a cadeia transportadora de electrões gera protões para suportar a síntese de ATP pela ATP sintetase membranar. Parte do ATP é utilizado para bombear protões para o exterior da célula. A acção da ATPase no transporte de protões e o processo de transferência de electrões mantêm um potencial electroquímico de protões ($\Delta\mu_H^+$) que contém o potencial de membrana, $\Delta\psi$ (negativo no interior) e um gradiente protónico, ΔpH (ácido no exterior). Ambos, o potencial de membrana e o gradiente protónico, são usados para suportar os processos de transporte secundários. Sendo ácidos fracos lipofílicos, protonóforos como o CCCP podem transportar protões do meio exterior ácido e libertar os protões no interior alcalino da célula. O transporte de protões pelo CCCP através da membrana plasmática causa um colapso do potencial de membrana e do gradiente protónico, diminuindo a actividade da ATPase. Consequentemente, a presença de protonóforos diminui a quantidade de ATP no interior da célula uma vez que promove a sua hidrólise e inibe a sua síntese (124).

1.3.3. Inibidores das ATPases membranares

1.3.3.1. Ortovanadato de Sódio

O vanádio tem amplo uso industrial, e a sua actividade biológica é de grande interesse para a ciência (78). Em solução aquosa é um metal de transição do grupo 5b (40). A química do vanádio é complexa, pois o metal pode existir em estados de oxidação de - 1 a + 5 e forma frequentemente polímeros (78). O vanádio é um elemento presente em pequenas concentrações no soro e tecidos de diferentes animais (105).

O vanadato em solução aquosa pode ser facilmente derivado numa variedade de ligandos (22) e tende a adoptar uma estrutura pentaédrica de geometria trigonal piramidal (4, 22) sendo o vanádio (V) o átomo central ligado a diferentes enzimas (22). O ortovanadato é um análogo do fosfato inorgânico (107, 120).

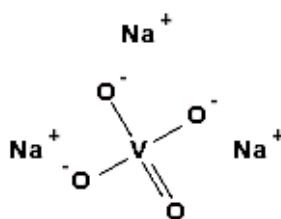


Figura 14 - Estrutura química do composto ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) (adaptado de 77).

Nos fluidos corporais a pH 4-8, a espécie predominante é o vanadato VO_3^- (estado de oxidação + 5). O vanadato pode entrar em algumas células por um sistema de transporte de aniões e ser reduzido pela glutatona a vanadil VO_2^+ (estado de oxidação + 4) (78). O vanadato tem demonstrado ter uma variedade de efeitos biológicos (40, 105) e bioquímicos tais como: (40)

- Possível estimulação directa da actividade da tirosina cinase;
- Aumento do cálcio (Ca^{2+}) e do pH intracelular;
- Efeitos na degradação intracelular de proteínas;
- Efeitos mitogenicos e aumento da síntese de DNA;
- Actuação como um sistema intracelular redox;
- Formação de esters covalentes com grupos hidroxil (*i.e.*, glucose e tirosina);
- Inibição da RNase e outras enzimas (40).

1.3.3.1.1. Mecanismo de acção

Os compostos de vanádio têm demonstrado inibir muitas enzimas tais como ATP fosfohidrolases, ribonuclease, fosfofrutocinase, esqualeno sintetase, fosfotirosil-proteína fosfatase (78), tirosina fosfatase (44), P-ATPases, ATPase translocadora de iões (13, 133), fosfolipase C de *Bacillus cereus* (116), fosfatase ácida, fosfatase alcalina, e adenilato cinase assim como uma série de enzimas da via glicolítica incluindo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglucomutase, fosfogliceromutase (4) e glucose-6-fosfatase (78). A inibição presumivelmente resulta do facto do vanádio adoptar uma estrutura estável a qual se assemelha ao estado de transição do fosfato durante as reacções que envolvem estas enzimas (4).

O vanádio é conhecido desde 1965 como inibidor de Na^+/K^+ ATPase. As propriedades físico-químicas do vanádio, a sua interacção com Na^+/K^+ ATPase, e a sua distribuição nos tecidos, colocam a hipótese do vanadato ser um potencial regulador das bombas de sódio-potássio (78).

Na Na^+/K^+ ATPase, o vanadato inibe por ligação ao local de fosforilação na ausência de nucleotídeos, estabilizando uma conformação de baixa energia do transportador (107).

A ATPase membrana de translocação de protões bacteriana, é também sensível ao vanadato (78).

O ortovanadato de sódio inibe a acção de BE ou de qualquer outro sistema que use a hidrólise de ATP como fonte de energia (4), tais como ATPases, fosfatases, cinases, e vários sistemas de transporte da família ATP-Binding Cassette (ABC) (45), actuando ao nível da translocação de ligandos (11).

Nas ATPases, esta inibição é não competitiva (37), sendo dependente da concentração do composto (71) e pode ser aumentada pela presença do ião potássio (37).

A adição de concentrações crescentes de vanadato leva à inibição progressiva da actividade da ATPase, a qual abranda ao longo do tempo. Sendo mais característico de um inibidor irreversível de actuação lenta, do que de um inibidor reversível (107).

1.3.3.2. Azida de Sódio

1.3.3.2.1. Mecanismo de acção

A azida é um inibidor das V-ATPases (H^+ -ATPases vacuolares) (48), reduzindo o potencial de membrana com a diminuição do transporte de prótons para o meio extracelular (141), inibindo a FPM, e é um inibidor da citocromo c oxidase com grande eficácia inibitória em eucariotas (132).

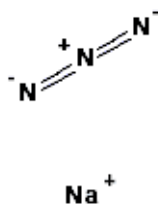


Figura 15 – Estrutura química do composto azida de sódio (NaN_3) (adaptado de 77).

A actividade enzimática da F_1F_0 ATPase é também inibida pela azida (13, 133), sendo um potente inibidor do domínio F_1 -ATPase inibindo a hidrólise de ATP (12, 37, 85). A síntese de ATP no domínio F_1 está directamente ligada à FPM através da membrana interna por rotação do anel c e do veio central em conjunto (12).

Para além das F-ATPases, outras ATPases são inibidas pela azida, tais como os transportadores ABC, a translocase SecA e a DNA topoisomerase II α . Crê-se que todas as ATPases sejam inibidas de uma forma semelhante às F-ATPases, ou seja, a presença da azida aumenta a afinidade do ADP, ligando-se ao local ocupado pela γ -fosfato do ATP quando o ATP está presente (12).

1.3.4. Inibidores (das ATPases dependentes) dos canais de cálcio

A actividade antimicrobiana das fenotiazinas é conhecida há mais de um século. A primeira fenotiazina a ser usada como antibacteriano foi o corante azul de metileno. Este corante pode tornar imóveis as bactérias móveis, assim como inibir o crescimento *in vitro* de algumas bactérias Gram-positivas (2). As fenotiazinas posteriormente

desenvolvidas, como a clorpromazina (119) e a tioridazina (2), para além das suas propriedades antipsicóticas têm uma ampla actividade antimicrobiana (119) sendo conhecida a sua actividade contra uma ampla gama de vírus, parasitas e protozoários. Têm actividade contra bactérias infecciosas, bactérias intracelulares resistentes aos antibióticos, tais como *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus*. Cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos, tais como *Shigella* spp., são mais susceptíveis a uma série de fenotiazinas enquanto que os bacilos Gram-negativos como *E. coli* e *Salmonella* spp, são mais resistentes (1). Este potencial antimicrobiano não tem sido usado devido à preocupação com os efeitos sedativos, efeitos colaterais e devido à cardiotoxicidade das fenotiazinas nas concentrações plasmáticas necessárias para alcançar efeitos bactericidas (119).

1.3.4.1. Mecanismo de acção

As fenotiazinas são conhecidas por alterar a morfologia das bactérias, quando a sua concentração é inferior à concentração que inibe a replicação celular. As fenotiazinas reduzem a aderência das bactérias Gram-negativas às células epiteliais. O uso de fenotiazina como antibacteriano não é viável, menores concentrações de fenotiazinas aumentam a actividade dos antibióticos para os quais a bactéria é susceptível, mesmo quando ela é resistente ao antibiótico. As últimas observações sugerem que estes compostos podem servir como adjuvantes sempre que há uma necessidade de reduzir a dose de um antibiótico ou tornar susceptível uma infecção resistente a antibióticos (1).

As fenotiazinas demonstraram capacidade de inibir o transporte de cálcio, prevenindo a ligação deste a proteínas transportadoras deste catião, como a calmodulina. Isto conduz, por sua vez a que enzimas que estão dependentes do cálcio, como as intervenientes nos processos de hidrólise do ATP (P-ATPases bacterianas ou bombas iónicas que translocam prótons por troca com iões sódio, potássio ou cálcio), sejam igualmente inibidas. Assim, as fenotiazinas conseguem inibir o efluxo dos compostos nocivos para a bactéria, pela diminuição da disponibilidade energética para as BEs, o que eventualmente permite que o antibiótico atinja o seu alvo sem ser efluxado (2, 68).

Tendo sido demonstrado que as fenotiazinas inibem o transporte de cálcio e potássio, e que inibindo o acesso do cálcio a proteínas celulares se promove a inibição da actividade das P-ATPases dependentes de cálcio o que conduz indirectamente à inibição dos processos de transporte de substratos por BE (2, 68), são por isso excelentes candidatos a inibidores específicos das mesmas a eventuais adjuvantes quimioterapêuticos (1, 103).

1.3.4.2. Clorpromazina (CPZ)

O interesse nas propriedades neurolépticas do corante azul de metileno ofuscou as suas propriedades antimicrobianas, mas contribuiu para a síntese do primeiro neuroléptico, a clorpromazina, amplamente usado para a terapia de psicoses o que com o amplo uso, levou a que se tornasse claro que a clorpromazina tinha propriedades antibacterianas (2).

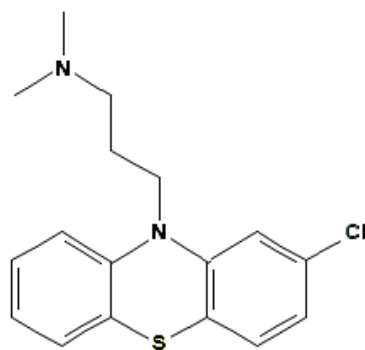


Figura 16 – Estrutura química do composto Clorpromazina ($C_{17}H_{19}ClN_2S$) (adaptado de 77).

1.3.4.3. Tioridazina (TZ)

A tioridazina é um antipsicótico com reconhecida actividade antimicrobiana, mas esta propriedade não foi aproveitada para uso clínico devido aos efeitos colaterais no sistema nervoso central e cardíaco (2). Este composto tem potencial para o tratamento de infecções intracelulares nos casos de resistência a antibióticos (1) sendo eficaz em concentrações clínicas contra *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (MDRTB) e *Staphylococcus aureus* resistente a metilcilina (MRSA), o seu uso no tratamento destas infecções poderia ser considerado (1).

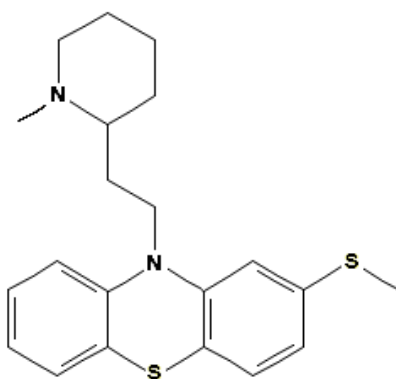


Figura 17 – Estrutura química do composto Tioridazina ($C_{21}H_{26}N_2S_2$) (adaptado de 77).

1.4. Metodologias de detecção do efluxo em bactérias

Dada a crescente presença de multirresistência bacteriana devido à sobre-expressão e sobre-actividade de BE em estirpes clínicas, sobretudo em doentes sob antibióterapias prolongadas, tornou-se urgente o desenvolvimento de métodos de detecção desta actividade, embora estes ainda se encontrem numa fase de investigação e desenvolvimento (129).

Não havendo ainda disponível, metodologias e tecnologias que permitam detectar rapidamente a presença destes fenómenos em estirpes isoladas de doentes sob antibióterapia, o único recurso disponível tem sido a determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) de cada estirpe para cada antibiótico na presença e ausência de compostos considerados IBEs. Sendo um método indirecto e pouco preciso, apenas permite uma qualificação indirecta da estirpe e a assumpção de que a multirresistência observada se deve à sobre-expressão e sobre-actividade de BE.

Vários métodos laboratoriais detectam e quantificam a actividade dos sistemas de BE bacterianos usando a medição de substratos acumulados pelas células que possuem marcação radioactiva ou são fluorescentes. No entanto, estes métodos na sua maioria, têm dificuldade em separar a acumulação de substrato da sua extrusão bem como não permitem a variação simultânea das condições ambientais requeridas para os estudos de bioenergética (103, 129). Como tal, métodos que permitam a detecção rápida e a quantificação do efluxo são hoje uma necessidade permanente no laboratório de

Microbiologia Médica, e a Unidade de Micobactérias do IHMT, onde este trabalho de tese foi desenvolvido, tem vindo a contribuir para o desenvolvimento de métodos que permitam a quantificação em tempo real do efluxo activo em bactérias usando marcadores fluorescentes que sejam efluxados pelas bactérias. Em particular foram desenvolvidas metodologias de detecção do transporte parietal do composto quaternário fluorescente brometo de etídeo (EtBr), usado como marcador visual da actividade de efluxo devido às suas características de baixa fluorescência quando no exterior das células, e máxima fluorescência aquando da sua ligação no interior das mesmas (89, 127, 129). Este composto fluorescente pode-se ligar transientemente a vários níveis no interior da bactéria como seja ao RNA de cadeia dupla, RNA de cadeia simples, DNA de cadeia simples, oligonucleótidos e proteínas (50) entrando por difusão passiva a favor do gradiente de concentração e sendo o seu excesso extruído das células pelos mecanismos de efluxo pois é substrato de vários sistemas de efluxo (89, 127, 129). Assim, a acumulação de EtBr na célula e o consequente aumento de fluorescência detectada é o resultado do equilíbrio dinâmico entre a difusão passiva no sentido do meio intracelular e o transporte activo mediado pelas BE no sentido inverso. Este equilíbrio é função de uma diversidade de factores como sejam a permeabilidade da parede celular, o grau de actividade de efluxo e de energização da célula, em particular o ambiente protónico extracelular avaliado pelo pH do meio, entre outros factores.

1.4.1. Método fluorimétrico semi-automático para monitorização do transporte de brometo de etídeo através de membranas e paredes celulares

Neste método, é analisada a acumulação e extrusão do fluorocromo EtBr, o qual é considerado substrato universal de BE (substrato específico do AcrAB-TolC), uma molécula biocompatível que, em condições definidas e controladas, não afecta a viabilidade celular nem as funções celulares (82, 89, 103, 129).

Para estabelecer as condições experimentais que permitam detectar diferenças na acumulação de EtBr por acção dos IBEs a estudar, foi necessário determinar as condições essenciais de cada ensaio para cada estirpe e cada composto a testar. Assim, foi necessário determinar:

(i) Qual a concentração de EtBr à qual a estirpe por si só não apresenta acumulação significativa de EtBr, ocorrendo apenas uma acumulação de EtBr residual e basal, resultante de um equilíbrio entre a entrada por difusão passiva do EtBr e a sua saída por efluxo activo. A fluorescência detectada em equilíbrio não deverá ultrapassar 20% da fluorescência máxima detectável no intervalo máximo de 30 minutos (*i.e.*, aproximadamente um tempo de geração de *E. coli*), a pH fisiológico (pH=7) e deverá estar abaixo do 1/2 da CMI do EtBr para a estirpe em estudo.

(ii) Qual a concentração dos compostos IBEs a testar (que por si só não podem ter fluorescência significativa) que não afecte a viabilidade celular. Para o efeito estabeleceu-se o 1/2 da CMI de cada composto para cada estirpe em estudo como a nível máximo a que se deveria trabalhar com um IBE, de forma a garantir a condição anterior.

(iii) Quais os compostos testados nas condições anteriores que promovem um aumento significativo de acumulação de EtBr na presença e na ausência de uma fonte de energia (glucose), sem que essa concentração de EtBr e de IBEs afecte a viabilidade celular, processo inibitório este que é monitorizado pelo atingir de um novo estado de equilíbrio entre a entrada por difusão passiva do EtBr e a sua saída por efluxo activo (agora diminuído/inibido pela acção do IBE) no intervalo máximo de 30 minutos (Figura 18).

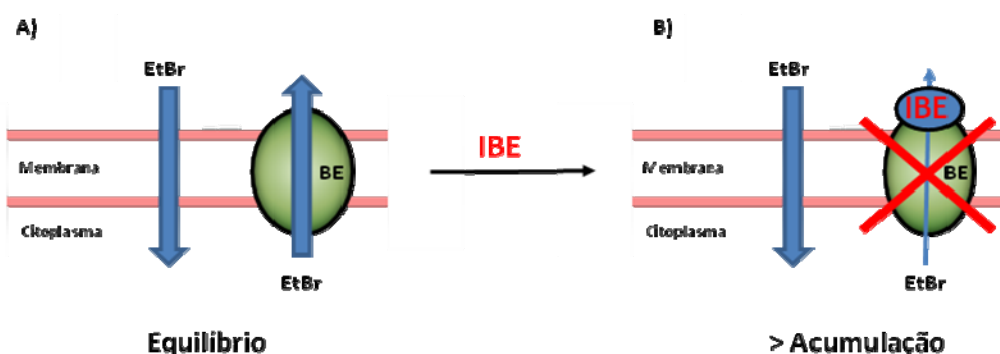


Figura 18 – Representação esquemática da entrada e efluxo de EtBr na célula de *E. coli*.

A) estado de equilíbrio da concentração de EtBr na célula (taxa de entrada \approx taxa de saída);

B) Acumulação de EtBr devido ao uso de IBE (taxa de entrada > taxa de saída).

Legenda: IBE (inibidor de bomba de efluxo), BE (bomba de efluxo).

O sinal de fluorescência é monitorizado utilizando um termociclador de tempo real Rotor-Gene[™] 3000 da Corbett Research (Sydney, Austrália), e os comprimentos de onda de excitação e emissão de 530nm bp e 585 nm hp, respectivamente (89). Num ensaio de acumulação, como o representado na Figura 19, é observada a capacidade de acumulação de EtBr pela célula. Esta fluorescência é maior, quanto maior a capacidade de acumulação de EtBr, e menor a capacidade de efluxo. Sabendo que a concentração de EtBr é o balanço entre a entrada de EtBr dentro da célula e a capacidade desta para o efluxar, a diferença de fluorescência (Δ) observada entre duas curvas, é uma medida da inibição do efluxo resultando na acumulação de EtBr na célula. A Figura 19 representa um exemplo teórico de duas possíveis curvas de acumulação para uma determinada estirpe em condições de acumulação diferentes (X e ●). Na presença de IBE (X), a estirpe acumula mais EtBr, ao invés na sua ausência (●) a capacidade de efluxo da estirpe não é inibida. Esta constitui, por isso, uma forma expedita e rigorosa de se avaliar o efeito de IBEs em estirpes bacterianas, tal como pretendido neste trabalho.

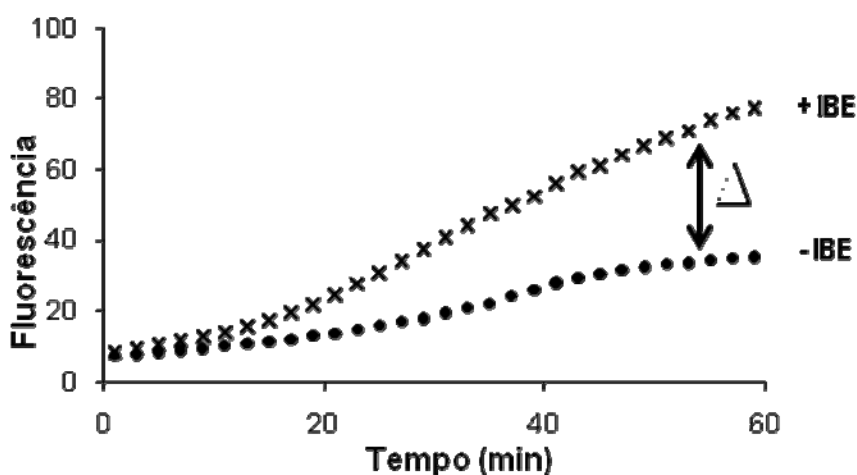


Figura 19 – Gráfico ilustrativo de um ensaio de acumulação de EtBr. (Δ) a diferença de fluorescência entre duas curvas, é uma medida do grau de inibição do efluxo provocado pelo IBE, resultando na acumulação de EtBr na célula. Legenda: (●) ausência de IBE e (X) presença de IBE.

1.5. Objectivos do trabalho

Como anteriormente referido, a resistência a antibióticos em bactérias Gram-negativas pode devida à extrusão activa do antibiótico através de sistemas de efluxo. Para se compreender de onde vem a energia para as BE funcionarem e como ao interferir com o fornecimento desta energia pode afectar a actividade de efluxo, foi efectuada uma extensa pesquisa bibliográfica, no sentido de encontrar compostos que consigam inibir directamente a actividade de efluxo, tais como desacopladores, inibidores das ATPases e inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio, com actividade potencial sobre a nossa bactéria modelo, *Escherichia coli*. Os inibidores da cadeia transportadora de electrões como os clássicos cianeto de potássio, rotenona ou antimicina A, dado que actuam a montante do processo energético que garante a actividade das BE tendo um efeito letal sobre todos os processos energéticos das células procariotas e eucariotas, não foram testados pois o objectivo é o de identificar potenciais inibidores de BE que actuem no fornecimento energético às bombas sem afectar o restante metabolismo celular ou a viabilidade celular de modo a que futuramente possam vir a ser usados como adjuvantes da antibioterapia (89, 127, 129).

Em *E. coli*, o principal sistema de efluxo é a bomba AcrAB-TolC da família RND, a qual funciona essencialmente abastecida pela energia que vem da FPM garantido pela eficiente actividade das ATPases bacterianas membranares, pelo que é um modelo académico excelente para o teste de compostos inibidores. Para tal, foram usadas três estirpes de *E. coli* bem caracterizadas:

- (i) *E. coli* AG100, estirpe selvagem que contém o sistema de efluxo AcrAB-TolC intacto e funcional;
- (ii) *E. coli* AG100A, que provém da estirpe AG100, nesta estirpe foram inactivados os genes que codificam para a principal bomba de efluxo AcrAB-TolC;
- (iii) *E. coli* AG100_{TET} que foi anteriormente induzida a um alto nível de resistência à tetraciclina (TET) e tem sobreexpressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC.

Da extensa pesquisa bibliográfica feita sobre possíveis compostos inibidores do fornecimento directo de energia às BE em *E. coli*, escolheu-se 6 compostos para este trabalho:

Como desacopladores o carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) e o 2,4 – dinitrofenol (2,4-DNP),

Como inibidores de ATPases membranares o ortovanadato de sódio e a azida de sódio,

Como inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio a tioridazina (TZ) e a clorpromazina (CPZ).

Os critérios de escolha destes compostos, tiveram como base a existência de registos na literatura, de possível acção directa ou indirecta na inibição de BE bacterianas por interferência no fornecimento de energia.

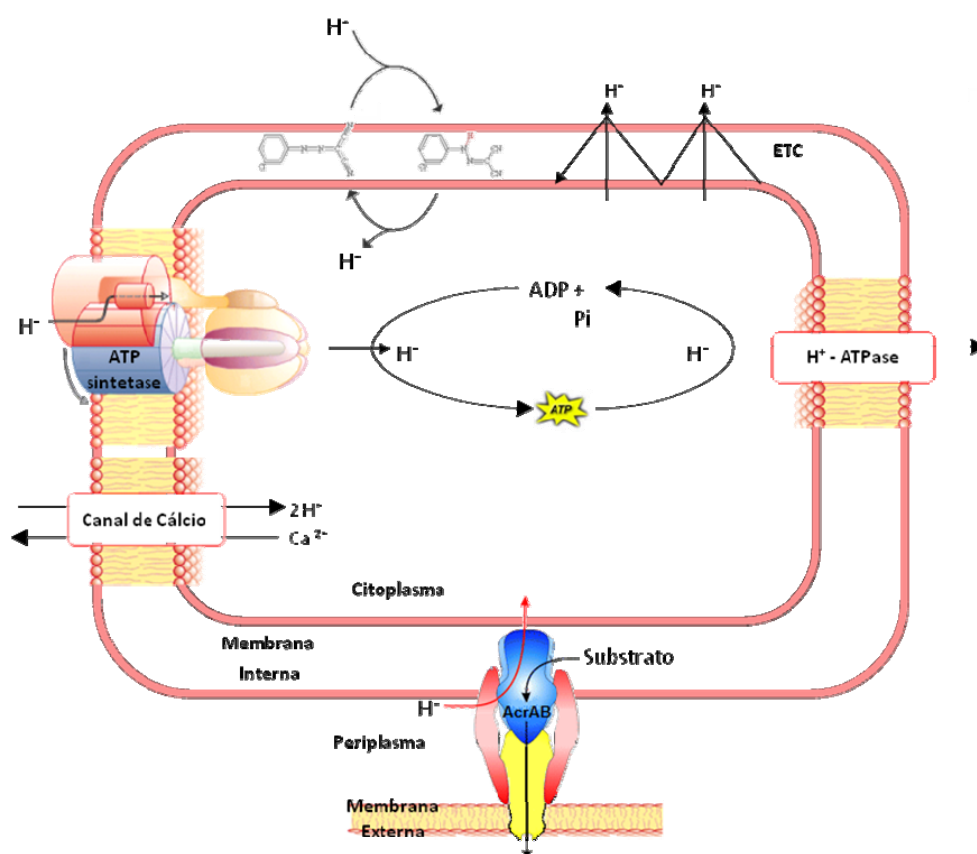


Figura 20 – Representação esquemática dos alvos celulares dos compostos CCCP, 2,4-DNP, ortovanadato de sódio, azida de sódio, TZ e CPZ (adaptado de 62, 99 e 124).

Assim, para avaliar a actividade inibitória destes compostos sobre o principal sistema de efluxo em *E. coli* testou-se, nas condições e com os critérios anteriormente descritos, as três estirpes de *E. coli* modelo com recurso ao método fluorimétrico semi automático que detecta em tempo real, a acumulação e efluxo do EtBr (89, 127, 129). Para este efeito foi necessário determinar o perfil de susceptibilidade para as três estirpes, por determinação dos valores de CMI (Concentração Mínima Inibitória) e CMB (Concentração Mínima Bactericida) para todos os compostos em estudo de forma a garantir que os efeitos observados se devem apenas à inibição da actividade de efluxo do EtBr, o substrato de eleição do sistema AcrAB-TolC (82, 89, 127, 129).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Estirpes Bacterianas

Estirpe selvagem *Escherichia coli* K-12 AG100 (*argE3 thi-1 rpsL xyl mtl Δ(gal-uvrB) supE44*), que contém o sistema de efluxo AcrAB-TolC intacto e funcional (86).

Estirpe *E. coli* K-12 AG100A (Δ *acrAB::Tn903* Kan^r), que provém da estirpe AG100. Nesta estirpe o sistema de efluxo AcrAB-TolC foi inativado devido a inserção do transposição Tn903 no operão *acrAB* (86).

As estirpes AG100 e AG100A foram caracterizadas e gentilmente cedidas pelo Dr. Hiroshi Nikaido (Departamentos de Química e Biologia Celular e Molecular, da Universidade da Califórnia, Berkeley, CA, E.U.A.).

A estirpe *E. coli* AG100, susceptível ao antibiótico tetraciclina (TET), foi induzida através de passos graduais de exposição a concentrações crescentes de tetraciclina até um nível elevado de resistência a este antibiótico (CMI de 12 mg/L de tetraciclina). A estirpe adaptada, capaz de sobreviver a uma concentração entre 8 e 10 mg/L de tetraciclina por expressão de bombas de efluxo (BE), em particular sobre-expressão do sistema AcrAB-TolC, designa-se por AG100_{TET} (126).

2.1.2. Meios de cultura, compostos e soluções

A composição e modo de preparação dos meios de cultura, compostos e soluções utilizados ao longo do trabalho encontram-se descritos nas Tabelas 1 a 5.

Todos os meios de culturas foram preparados com água bidestilada e esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos a 1 bar.

Tabela 1 - Composição de meios de cultura utilizados.

Meio de cultura	Composição (por litro)
Luria Bertani (LB)	10 g de peptona caseína ⁽²⁾ ; 5 g de extracto de levedura ⁽²⁾ ; 10 g de cloreto de sódio ⁽³⁾
Luria Bertani agar (LA)	LB; 20 g de agar ⁽¹⁾
Mueller-Hinton broth (MHB) ⁽¹⁾	300 g de infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g de amido; 4,347 mg Ca ²⁺ ; 6,206 mg Mg ²⁺ ; pH 7,3 ± 0,1 a 25°C
Mueller-Hinton agar (MHA) ⁽¹⁾	MHB; 17 g de agar ⁽¹⁾ ; pH 7,3 ± 0,1 a 25°C

(1) Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra; (2) Merck, Darmstadt, Germany; (3) Panreac Química SA, Barcelona, Espanha.

Tabela 2 - Composição e modo de preparação de soluções utilizadas.

Solução	Composição
PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X, pH 7 ⁽¹⁾	1 pastilha dissolvida em 200mL de água bidestilada corresponde a 10 mM tampão fosfato; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl.
PBS 1X, pH 5 ⁽¹⁾	Para a solução de PBS 1X a pH 5, acertou-se o pH da solução PBS 1X a pH 7 através da adição de uma solução de cloreto de hidrogénio (HCl) ⁽³⁾ (◊).
PBS 1X, pH 8 ⁽¹⁾	Para a solução de PBS 1X a pH 8, acertou-se o pH da solução PBS 1X a pH 7 através da adição de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) ⁽²⁾ (◊).
Glucose ^(2,θ)	0,2 g/mL em água bidestilada estéril.

(1) Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany; (2) Merck, Darmstadt, Germany; (3) Panreac Química SA, Barcelona, Espanha; (◊) Utilizou-se um medidor de pH Metrohm Herisau 632, Switzarland; (θ) a solução depois de preparada foi filtrada com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22 µm de diâmetro de poro da Rotilabo ® Spritzenfilter Steril, Karlshure, Alemanha.

Tabela 3 - Composição e modo de preparação das soluções de desacopladores, soluções de inibidores de cadeia transportadora de electrões, soluções de inibidores de ATPases e soluções de inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio utilizadas.

Solução	Composição / Preparação da solução “stock”
Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) ⁽¹⁾ (pm = 204,6158 g/mol)	1 mg/mL em água bidestilada estéril e metanol ⁽³⁾ 1:1 (Δ). Diluições preparadas em água bidestilada estéril. Armazenado ao abrigo da luz.
2,4,-dinitrofenol (DNP) ⁽¹⁾ (pm = 184,10636 g/mol)	30 mg/mL em água bidestilada estéril e etanol absoluto ⁽⁴⁾ 1:1 (Δ). Diluições preparadas em água bidestilada estéril. Mantida ao abrigo da luz.
Tioridazina (TZ) ^(1,ø) (pm = 370,57454 g/mol)	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Clorpromazina (CPZ) ^(1,ø) (pm = 318,86416 g/mol)	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Azida de sódio (NaN ₃) ⁽²⁾ (pm = 65,00987 g/mol)	12 mg/mL em água bidestilada estéril
Ortovanadato de sódio (Na ₃ VO ₄) ⁽¹⁾ (pm = 183,908410 g/mol)	8 mg/mL em água bidestilada estéril (Δ)

(1) Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany; (2) Sigma Chemical Co., St. Louis, USA (3) Merck, Darmstadt, Alemanha; (4) Panreac Química Sau, Barcelona, Espanha; (Δ) Necessário aquecimento a 50°C numa placa de aquecimento até dissolução total do composto; (ø) as soluções depois de preparadas foram filtradas com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22 µm de diâmetro de poro.

As soluções stock foram armazenadas a -20°C. A diluição de todas as soluções stock foi feita em água bidestilada estéril.

Como inibidores da ATPase utilizou-se os compostos: azida de sódio (NaN_3), e ortovanadato de sódio (Na_3VO_4). Os compostos carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) e 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) foram usados devido às suas propriedades de desacopladores. E como inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio utilizou-se a tioridazina (TZ) e a clorpromazina (CPZ).

Tabela 4 - Composição e modo de preparação de soluções de substratos de bombas de efluxo utilizadas.

Solução	Composição / Preparação da solução “stock”
Brometo de etídeo (EtBr) ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril (Δ) Mantida ao abrigo da luz, a 4°C
Solução (para o ensaio de acumulação)	Composição / Preparação da solução
EtBr ⁽¹⁾ pH 5	2 mg/L e 1 mg/L em PBS 1X a pH 5
EtBr ⁽¹⁾ pH 7	2 mg/L e 1 mg/L em PBS 1X a pH 7
EtBr ⁽¹⁾ pH 8	2 mg/L e 1 mg/L em PBS 1X a pH 8

(1) Sigma Chemical Co., St. Louis, USA; (Δ) Necessário aquecimento a 50°C numa placa de aquecimento Hotplate magnetic stirrer 34532 - Snijders Scientific Tilburg, Holland, até dissolução total do composto.

Tabela 5 - Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizadas.

Solução	Composição / Preparação da solução “stock”
Tetraciclina (TET) ⁽¹⁾	1 mg/mL metanol ⁽²⁾
Canamicina (KAN) ⁽¹⁾	20 mg/ mL água bidestilada estéril (*)

(1) Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany; (2) Merck, Darmstadt, Alemanha; (*) Esta solução foi filtrada com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22 μm de diâmetro de poro.

2.2. Métodos

2.2.1. Cultivo das Estirpes Bacterianas

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido LB e em meio sólido LA.

Para o crescimento da estirpe AG100A suplementou-se o meio com 100 mg/L de KAN, para evitar a perda do transposição Tn903.

Para o crescimento da estirpe AG100_{TET} suplementou-se o meio com 8 mg/L de TET.

Foram mantidos “stocks” a -80°C de culturas em meio líquido, suplementado com 10% (v/v) de glicerol (J.T. Baker, Philipsburg, E.U.A.).

Para determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) e concentrações mínimas bactericidas (CMBs), as estirpes foram cultivadas em meio MHB e meio MHA, respectivamente.

2.2.2. Determinação de CMI (Concentração Mínima Inibitória) pelo método de diluição em microplaca (microdiluição) para as três estirpes de *E. coli* em estudo

Entende-se por Concentração Mínima Inibitória (CMI) a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição seriada em agar ou diluição em meio líquido (20).

Neste trabalho, a CMI de cada agente foi determinada pelo método líquido de microdiluição seriada, em placas de 96 poços, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), tendo sido testadas várias gamas seriadas de concentrações para determinação exacta da CMI.

Antes de cada determinação de CMI foram feitas culturas frescas das estirpes a estudar, estirpe AG100, em meio LA; estirpe AG100A, em meio LA suplementado com 100 mg/L de KAN; estirpe AG100_{TET}, em meio LA suplementado com 8 mg/L de TET. Incubaram-se as placas a 37°C, durante a noite. A partir das culturas frescas em placa,

prepararam-se culturas em meio líquido, por inoculação de colónias isoladas, como se segue:

estirpe AG100, em meio MHB; estirpe AG100A, em meio MHB suplementado com 100 mg/L de KAN; estirpe AG100_{TET}, em meio MHB suplementado com 8 mg/L de TET. Incubaram-se os tubos a 37°C, com agitação (200 – 220 rpm), durante a noite.

Na Tabela 6 indica-se a gama de concentrações utilizadas na determinação da CMI para os compostos testados.

Tabela 6 – Gama de concentrações dos compostos utilizados.

Composto	Concentração da Solução Stock (mg/mL)	Gama de concentrações utilizadas (mg/L)
CCCP	1	0,15 a 80
EtBr	8	1,2 a 600
NaN ₃	12	0,8 a 920
2,4-DNP	30	1,1, a 580
Na ₃ VO ₄	8	10 a 5000
CPZ	4	0,6 a 300
TZ	3	0,4 a 200

As CMIs das estirpes foram realizadas em meio MHB contendo diferentes concentrações do composto a testar (Tabela 6), obtidas pelo método de diluição seriada. Em todos os ensaios e para todas as estirpes efectuaram-se quatro tipos de controlo: i) controlo de esterilidade (MHB); ii) controlo de crescimento (MHB e estirpe), de forma a se poder avaliar a viabilidade das estirpes; iii) controlo do solvente (MHB, estirpe e solvente na mesma concentração utilizada na preparação dos compostos), para garantir que o solvente não tem efeito inibitório no crescimento celular; iv) controlo do composto (MHB e composto), como controlo de turbidez para a leitura dos resultados finais.

A cada poço da placa de 96 poços contendo meio MHB foi adicionado 25 µl de composto e efectuadas diluições seriadas por um factor de dois, de modo a obter-se as gamas de concentrações desejadas (Tabela 6). Posteriormente, cada poço foi inoculado com 10% (v/v) de inóculo, previamente ajustado à escala 0,5 de McFarland em tampão PBS 1X (à excepção do controlo de esterilidade do meio), para um volume final de 200 µl. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas, e a leitura dos resultados realizada visualmente após esse período de incubação. Cada ensaio foi validado através da presença de crescimento no respectivo controlo de crescimento (controlo positivo) e ausência de crescimento no controlo de esterilidade do meio (controlo negativo). O crescimento da estirpe observado nos poços que contêm o composto em estudo deve ser comparado com o controlo de crescimento, controlo do composto e controlo de solvente, usado em cada conjunto de testes. Os ensaios de determinação da CMI foram realizados em triplicado para cada composto.

2.2.3. Determinação de CMB (Concentração Mínima Bactericida) para as três estirpes de *E. coli* em estudo

Após determinar a CMI, determinaram-se as CMBs das culturas dos poços que não apresentaram crescimento visível. As CMBs foram realizadas em MHA e incubaram-se a 37°C, durante 18 horas. Após esse período, registou-se qual a placa que não apresentou crescimento. O valor da concentração de composto correspondente no poço de microdiluição corresponde à CMB para o composto e estirpe testada (57). A CMB definida como a concentração que elimina pelo menos 99.9% das bactérias do inóculo original (57, 117) foi determinada em triplicado para cada composto.

2.2.4. Fluorimetria em Termociclador de Tempo Real Rotor-Gene™ 3000

Com base no protocolo padronizado na Unidade de Ensino e Investigação de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, tendo como estirpe padrão a *E. coli* AG100, e como fluorocromo para monitorização do transporte, o brometo de etídeo (EtBr), analisou-se a acumulação deste substrato do principal sistema de efluxo de *E. coli*, o sistema AcrAB-TolC (89, 127, 129).

Esta técnica é realizada num termociclador Rotor-Gene™ 3000 (Corbett-Research, Sydney, Austrália), utilizando um programa que permite fazer a leitura em tempo real da emissão de fluorescência do EtBr nos comprimentos de onda de excitação (530 nm) e emissão (585 nm) deste composto. O EtBr possui dois níveis de fluorescência distintos, tendo um sinal muito fraco no exterior da célula bacteriana e sendo o sinal amplificado no interior da célula (89, 127, 129). Assim, este método fornece uma estimativa do transporte cinético do EtBr, reflectindo o balanço entre a sua acumulação intracelular através de difusão passiva (pela permeabilidade membranar) e a sua extrusão através de sistemas de efluxo (89, 111).

2.2.4.1. Protocolo de acumulação de brometo de etídeo (EtBr)

Preparação das estirpes em estudo: Procedeu-se ao crescimento das culturas de *E. coli*, em 10 mL de meio LB, a 37°C, com agitação (220 rpm). O crescimento celular foi acompanhado, por medição da densidade óptica (DO) a 600nm num espectrofotómetro (PU8620 UV/VIS/NIR, Philips, Cambridge, Reino Unido), até uma DO₆₀₀ de 0,6. Uma vez atingido este valor, que corresponde à fase exponencial de crescimento, as células foram recolhidas em alíquotas de 1 mL, por centrifugação a 13000rpm, durante 3 minutos à temperatura ambiente, numa minicentrífuga (Biofuge pico Heraeus, Kendro Laboratory Products, Osterode, Alemanha).

O sedimento foi lavado duas vezes, sendo a primeira com tampão PBS 1X a pH 7 e a segunda com tampão PBS 1X ao pH desejado (pH 5, pH 7 ou pH 8). A preparação do tampão PBS aos diferentes pH encontra-se descrita na Tabela 2. Cada sedimento celular foi ressuspensionado em 1 mL de PBS 1X ao pH desejado e transferido para um tubo de

15mL. Para todos os ensaios, ajustou-se a DO_{600} da suspensão celular a 0,6, por adição do tampão anterior, de forma a obter uma boa concentração celular para os parâmetros de leitura de fluorescência no sistema usado (127).

Ensaio de acumulação de EtBr: Os ensaios de fluorometria foram realizados em microtubos de 200 μ L, em alíquotas com um volume final de 100 μ L (valor recomendado pelo manual de apoio do termociclador Rotor-GeneTM 3000), tendo sido testadas diferentes condições energéticas (pH, e fonte de energia) para se poder avaliar o efeito dos inibidores na acumulação de EtBr.

Para cada ensaio foram preparados diferentes tubos com as condições experimentais pretendidas e respectivos controlos, como a seguir se esquematiza:

- i) 50 μ L de EtBr e 50 μ L de PBS;
- ii) 98 μ L PBS 1X a pH7 e 2 μ L de glucose (GLU) numa concentração final (C_f) de 0,4% (127);
- iii) 50 μ L da suspensão celular, 50 μ L de PBS 1X a pH 7;
- iv) 50 μ L de EtBr, 48 μ L de PBS e 2 μ L de 0,4% GLU (C_f);
- v) 50 μ L da suspensão celular, 48 μ L de PBS 1X a pH 7 e 2 μ L de 0,4% GLU (C_f);
- vi) 50 μ L da suspensão celular, 48 μ L de EtBr e 2 μ L de 0,4% GLU (C_f);
- vii) 5 μ L de solução “stock” de inibidores e 95 μ L de PBS;
- viii) 5 μ L de solução “stock” de inibidores, 50 μ L de EtBr e 45 μ L de PBS;
- ix) 5 μ L de solução “stock” de inibidores, 50 μ L de EtBr, 43 μ L de PBS e 2 μ L de 0,4% GLU (C_f);

Para os pontos i), iv), vi), vii), viii) e ix) os ensaios foram realizados a pH 5, pH 7 e a pH 8, (Tabela 2 e Tabela 4). Para os pontos vii), viii) e ix) a C_f de inibidores utilizada foi igual a 1/2 da CMI.

Juntamente com os tubos controlo, em cada ensaio foram testados os inibidores a diferentes pH e na presença / ausência de GLU conforme se segue:

- i) 50 μ L de suspensão celular e 50 μ L de EtBr;
- ii) 50 μ L da suspensão celular, 5 μ L de solução “stock” de inibidores e 45 μ L de PBS;
- iii) 50 μ L da suspensão celular, 5 μ L de solução “stock” de inibidores e 45 μ L de EtBr;
- iv) 50 μ L da suspensão celular, 5 μ L de solução “stock” de inibidores, 43 μ L de EtBr e 2 μ L de 0,4% GLU (C_f);

Para os pontos i), ii), e iii) os ensaios foram realizados a pH 5, pH 7 e a pH 8, (Tabela 2 e Tabela 4). Para os pontos ii), iii) e iv) a C_f de inibidores utilizada foi igual a 1/2 da CMI.

Os tubos foram depois colocados num rotor de 36 tubos no aparelho Rotor-GeneTM 3000. As medições fluorimétricas, em tempo real, foram efectuadas a 37°C, utilizando o filtro para comprimentos de onda de excitação de 530 nm “band-pass” (bp) e como filtro de detecção o filtro de 585 nm “high-pass” (hp), canal A.530/585hp (67). A medição fluorimétrica decorreu por um período de 30 minutos (cerca de 30 ciclos de 60 segundos cada) e as leituras foram efectuadas após cada ciclo. Cada ensaio foi realizado em triplicado.

2.2.4.2. Determinação da viabilidade celular

Com o intuito de obter uma estimativa do número de células viáveis após cada ensaio no Rotor-GeneTM 3000, para garantir que as concentrações de inibidores utilizadas não estão a afectar a viabilidade celular, efectuaram-se diluições sucessivas ($10^0 - 10^{-5}$) de cada amostra e dos controlos em PBS e plaqueou-se um volume de 100 μ L em placas com meio MHA.

Após 18 horas de incubação a 37°C, contou-se o número de unidades formadoras de colónias (CFU).

3. RESULTADOS

Com o intuito de responder às questões colocadas neste trabalho (qual o principal fornecedor de energia para a principal bomba de efluxo (BE) de *E. coli*, o sistema AcrAB-TolC e quais os compostos que podem actuar como inibidores deste processo), foi feita uma extensa pesquisa bibliográfica, no sentido de encontrar desacopladores, inibidores de ATPases membranares e inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio.

De acordo com os critérios anteriormente referidos (vide capítulo Introdução, secção 1.4.1.), foram escolhidos seis compostos, que incluem dois inibidores de ATPase (azida de sódio e ortovanadato de sódio), dois desacopladores (carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona e 2,4-dinitrofenol) e dois inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio consequentemente inibidores das ATPases dependentes deste catião (clorpromazina e tioridazina).

3.1. Determinação das concentrações mínimas inibitórias e concentrações mínimas bactericidas dos compostos em estudo para as estirpes AG100, AG100A e AG100_{TET}

O perfil de susceptibilidade das estirpes AG100, AG100A e AG100_{TET}, foi determinado por cálculo dos valores de CMI (concentração mínima inibitória) e CMB (concentração mínima bactericida) para o brometo de etídeo (EtBr), desacopladores, inibidores de ATPases membranares e inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio. Os valores de CMI e CMB para cada composto encontram-se nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

A eficiência de um antibiótico é caracterizada pela sua CMI, sendo esta definida como a menor concentração de um composto antimicrobiano suficiente para impedir o crescimento visível de um microrganismo. Este valor reflecte o sucesso de um antibiótico em atravessar todas as barreiras na célula bacteriana e atingir o seu alvo. No

entanto, diferentes mecanismos de resistência podem interagir para aumentar o nível de resistência. A inibição de um mecanismo de resistência por um antibiótico pode aumentar a susceptibilidade da bactéria a esse agente específico, podendo no entanto também restaurar ou melhorar a actividade de uma segunda classe de antibióticos (137).

Tabela 7 - Valores de CMI obtidos para substratos de bombas de efluxo, desacopladores, inibidores de ATPase e inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio nas três estirpes de *E. coli* em estudo.

Agente	CMI					
	AG100		AG100A		AG100 _{TET}	
	mg/L	M	mg/L	M	mg/L	M
EtBr (*)	150	380×10^{-9}	5	$12,6 \times 10^{-9}$	300	760×10^{-9}
CCCP (◇)	10	$48,8 \times 10^{-9}$	10	$48,8 \times 10^{-9}$	20	$97,7 \times 10^{-9}$
2,4-DNP (◇)	290	$1,57 \times 10^{-6}$	290	$1,57 \times 10^{-6}$	145	788×10^{-9}
CPZ (□)	60	188×10^{-9}	20	$62,7 \times 10^{-9}$	140	439×10^{-9}
TZ (□)	100	269×10^{-9}	25	$67,4 \times 10^{-9}$	200	539×10^{-9}
NaN ₃ (Δ)	230	$3,5 \times 10^{-6}$	230	$3,5 \times 10^{-6}$	230	$3,5 \times 10^{-6}$
Na ₃ VO ₄ (Δ)	5000	27,2	5000	27,2	2500	13,6

Legenda: (*) Substrato de bombas de efluxo; (◇) desacoplador; (□) Inibidor das ATPases dependentes dos canais de cálcio; (Δ) inibidor de ATPases membranares; CMI: concentração mínima inibitória; M= molar; EtBr - Brometo de Etídeo; CCCP - Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; 2,4-DNP - 2,4-Dinitrofenol, CPZ - Clorpromazina; TZ - Tioridazina; NaN₃ - Azida de Sódio; Na₃VO₄ - Ortovanadato de Sódio.

Os valores são a média de pelo menos três ensaios independentes, com resultados consistentes.

Tabela 8 - Valores de CMB obtidos para substratos de bombas de efluxo, desacopladores, inibidores de ATPase e inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio nas três estirpes de *E. coli* em estudo.

Agente	CMB					
	AG100		AG100A		AG100 _{TET}	
	mg/L	M	mg/L	M	mg/L	M
EtBr (*)	150	480x10 ⁻⁹	10	25,3x10 ⁻⁹	500	1,26x10 ⁻⁶
CCCP (◇)	10	48,8x10 ⁻⁹	10	48,8x10 ⁻⁹	20	97,7x10 ⁻⁹
2,4-DNP (◇)	580	3,15x10 ⁻⁶	>580	>3,15x10 ⁻⁶	580	3,15x10 ⁻⁶
CPZ (□)	60	188x10 ⁻⁹	40	125,3x10 ⁻⁹	280	878x10 ⁻⁹
TZ (□)	200	538x10 ⁻⁹	50	134,5x10 ⁻⁹	800	215,6x10 ⁻⁸
NaN ₃ (Δ)	>920	>14x10 ⁻⁶	>920	>14x10 ⁻⁶	>920	>14x10 ⁻⁶
Na ₃ VO ₄ (Δ)	6000	32,6x10 ⁻⁶	>6000	>32,6x10 ⁻⁶	6000	32,6x10 ⁻⁶

Legenda: (*) Substrato de bombas de efluxo; (◇) desacoplador; (□) Inibidor das ATPases dependentes dos canais de cálcio; (Δ) inibidor de ATPases membranares; CMB: concentração mínima bactericida; M= molar; EtBr - Brometo de Etídeo; CCCP - Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; 2,4-DNP - 2,4-Dinitrofenol, CPZ - Clorpromazina; TZ - Tioridazina; NaN₃ - Azida de Sódio; Na₃VO₄ - Ortovanadato de Sódio.

Os valores são a média de pelo menos três ensaios independentes, com resultados consistentes.

Como se observa na Tabela 7, a estirpe AG100A (*ΔacrAB::Tn903 Kan^r*) apresenta uma susceptibilidade ao EtBr 30 vezes superior à da estirpe AG100. No respeitante à estirpe AG100_{TET}, onde ocorre sobre expressão do sistema AcrAB-TolC, a CMI para o EtBr é duas vezes superior à da estirpe selvagem. Estes resultados demonstram que, a bomba AcrAB-TolC tem um papel importante na extrusão do EtBr. A confirmação experimental destes resultados, já reportado em trabalhos anteriores (89, 126), é fundamental para a validação dos modelos experimentais escolhidos para o teste às hipóteses colocadas nesta tese.

Igualmente, verificam-se significativas diferenças nas CMI's da estirpe AG100A para o composto TZ, apresentando um valor de CMI 4 vezes inferior à estirpe AG100 e para o composto CPZ, que apresenta um valor de CMI 3 vezes inferior. A CMI do composto CPZ para a estirpe AG100_{TET} é 2,3 vezes superior à da estirpe AG100. Estes resultados indiciam que, como no caso de outros inibidores de bombas de efluxo (IBE), as fenotiazinas podem ser elas próprias substrato das bombas, pelo que estes compostos poderão ter um efeito inibitório múltiplo: quer competitivo, quer depletor de energia para o efluxo (63, 67).

No caso dos restantes compostos a estudar: CCCP, 2,4-DNP, NaN₃ e Na₃VO₄ o valor de CMI para as estirpes AG100 e AG100A é o mesmo, verificando-se apenas algumas diferenças, na ordem de uma diluição, entre AG100_{TET} e AG100. Nenhum destes compostos apresenta assim sinais de ser transportado pelo sistema AcrAB-TolC.

Os valores de CMI e CMB apresentados nas Tabelas 7 e 8 são a média de três ensaios independentes e todos apresentaram resultados concordantes. As experiências realizadas tendo como controlo os solventes (DMSO, 50% etanol ou 50% metanol) mostraram que nenhum dos solventes tem efeito significativo no crescimento celular e na viabilidade (resultados não apresentados), não havendo portanto inibição do crescimento das estirpes pelos solventes usados.

3.2. Aplicação do método fluorimétrico semi-automático para monitorização do transporte de brometo de etídeo

Neste estudo, o método fluorimétrico semi-automático de monitorização do transporte de EtBr, desenvolvido na Unidade de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (127, 129), foi seleccionado com o intuito de identificar e avaliar os compostos anteriormente seleccionados como potenciais inibidores específicos de BE, bem como para permitir efectuar estudos preliminares de bioenergética do sistema AcrAB-TolC de *E. coli*.

Esta técnica permite detectar de forma rápida, precisa e reprodutível o transporte de EtBr através da parede celular bacteriana em concentrações de trabalho que não interfiram com a viabilidade celular nem perturbam as funções celulares, usando uma metodologia que permite a distinção entre acumulação e efluxo, ou seja, a direcção de transporte do EtBr através da membrana celular.

3.2.1. Parâmetros base na caracterização do transporte de EtBr

De forma a auxiliar a leitura e interpretação dos resultados que se apresentam de seguida, convém relembrar que a acumulação de EtBr na célula bacteriana é o resultado do equilíbrio dinâmico entre a difusão passiva no sentido do meio intracelular e a extrusão activa, mediada por BE, no caso particular de *E. coli*, pelo sistema AcrAB-TolC, que o efectua utilizando a força proto-motriz (FPM). Este equilíbrio é função de uma diversidade de factores como sejam a permeabilidade da parede celular, o grau de actividade de efluxo e de energização da célula, em particular o pH do meio extracelular, entre outros factores. Quando se ultrapassa a concentração de equilíbrio entre a difusão passiva e o efluxo activo de EtBr, este irá ligar-se irreversivelmente aos componentes intracelulares, em particular aos ácidos nucleicos, e como tal não poderá ser extrusado por efluxo. Uma vez no interior da célula ocorre um incremento do sinal de fluorescência do EtBr face a soluções de EtBr livre, como resultado da sua ligação transiente a diversos alvos intracelulares (89, 131).

Crêterios utilizados para todos os ensaios de acumulação e compostos testados neste trabalho, com recurso ao método fluorimétrico semi-automático de monitorização do transporte de EtBr através de membranas e paredes celulares:

- A concentração de EtBr livre no ambiente extracelular em cada ensaio deverá permitir o estabelecimento do equilíbrio entre a entrada por difusão passiva do EtBr e a sua saída por efluxo activo, não afectando de alguma forma a viabilidade celular. A fluorescência detectada em equilíbrio não deverá ultrapassar 20% da fluorescência máxima detectável no intervalo máximo de 30 minutos a pH fisiológico (pH=7) e deverá estar abaixo de 1/2 da CMI do EtBr para a estirpe em teste;
- A concentração de composto a testar como possível inibidor do efluxo não deverá exceder 1/2 da CMI para a estirpe a ser testada, de modo a não afectar a viabilidade celular. A garantia de viabilidade é um requisito fundamental para a correcta análise do efeito de um determinado composto sobre a actividade de efluxo uma vez que não se pretende que ocorram variações na fluorescência detectada por variação dos efectivos celulares. Assim, os ensaios são efectuados em tampão fostato e durante não mais de 30 minutos (para evitar o eventual aumento de efectivos por multiplicação celular), utilizando concentrações dos compostos a testar que não ultrapassem 1/2 das respectivas CMIs (diminuição de efectivos por interferência na viabilidade);
Após a determinação da viabilidade celular, observou-se que as concentrações dos compostos utilizadas não causaram diminuição significativa no crescimento (dados não apresentados).
- O composto não deve interferir com o sinal de fluorescência no termociclador de tempo real;
- Deverá ser garantida às celulas condições ideais de fornecimento de energia (glucose a 0,4%) em pelo menos um tubo com o composto em teste para garantir que, mesmo nas condições óptimas de fornecimento de energia, o efeito inibitório do composto sobre o efluxo   visível. Sem esta condição poder-se-ia verificar inibição do transporte por depleção natural da energia celular durante o ensaio.

Todos estes critérios foram respeitados através da inclusão, em cada ensaio realizado, e para todos os compostos e estirpes testados neste trabalho, de tubos controlo de acordo com o descrito no capítulo Material e Métodos, secção 2.2.4.1. Nenhum dos controlos apresentou fluorescência significativa nos ensaios efectuados. Como exemplo estão apresentados na Figura 21 os resultados obtidos para os controlos (i) a (iv) que, para facilitar a leitura e interpretação dos resultados dos restantes gráficos foram aqui analisados separadamente.

As três estirpes em estudo foram expostas a concentrações crescentes de EtBr de 0.05 mg/L a 2,5 mg/L, com o objectivo de determinar a concentração de EtBr a partir da qual se começa a detectar acumulação nas células (dados não apresentados). A concentração imediatamente abaixo dessa será a concentração para a qual as células são capazes de manter um equilíbrio entre a entrada do EtBr por difusão passiva e a sua extrusão pelos sistemas de efluxo intrínsecos. Os resultados da detecção fluorimétrica da acumulação de concentrações crescentes de EtBr mostrou que para a estirpe AG100A, uma concentração de EtBr de 0.5 mg/L e para as estirpes AG100 e AG100_{TET} uma concentração de EtBr de 1 mg/L, apresentam a mesma fluorescência residual/basal e são as concentrações que podem ser usadas como limite inferior de acumulação para as três estirpes em estudo. Deste modo, as concentrações de EtBr utilizadas nos ensaios de acumulação não são iguais para as três estirpes, pois a estirpe AG100A tem o principal sistema de efluxo AcrAB-TolC inactivado, não tendo por isso capacidade para extrusar tão facilmente o EtBr (substrato do sistema AcrAB-TolC), o que se comprova pelo facto de a CMI do EtBr para a estirpe AG100A ser 30 vezes inferior relativamente à estirpe selvagem AG100, vide Tabela 7, o que faz com que a AG100A tenha maior susceptibilidade a este composto. Anteriormente já tinha sido estudado e concluído que em *E. coli* a concentração óptima de EtBr para estudar a acumulação é de 1 mg/L (67), podendo esta concentração variar conforme a estirpe com que se está a trabalhar, e que numa concentração inferior a 0.5 mg/L o sinal está abaixo da sensibilidade do instrumento (111).

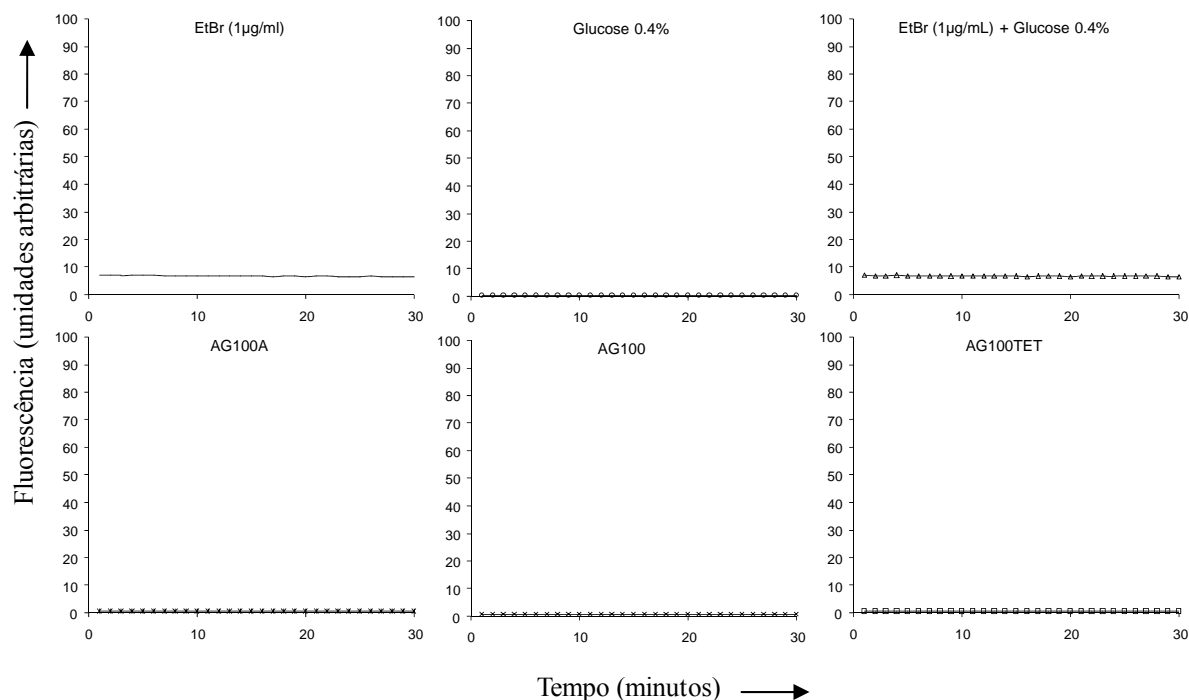


Figura 21 - Monitorização da intensidade de fluorescência dos controlos a 37°C, ao comprimento de onda de excitação de 530 nm bp e de emissão de 585 nm hp.

3.2.2. Influência de desacopladores na acumulação de EtBr

Desacopladores são compostos que permitem rearranjos e translocações transientes dos protões existentes na superfície interna e externa da bicamada lipídica das membranas celulares, levando ao colapso do gradiente protónico transmembranar ($\Delta\mu_{\text{H}}^+$) necessário para assegurar a síntese de ATP e o transporte membranar. Consequentemente a sua presença activa as ATPases da membrana plasmática diminuindo a síntese de ATP e aumentando a sua utilização/hidrólise, pois as células são forçadas a hidrolisar ATP para rapidamente poderem restabelecer o potencial protónico e sobreviver.

Utilizou-se os compostos 2,4-DNP e CCCP com o objectivo de estudar a sua influência na inibição do efluxo e consequente, acumulação de EtBr nas células de *E. coli* utilizadas neste estudo. Os resultados obtidos através de ensaios de acumulação, pelo método fluorimétrico semi-automático de monitorização do transporte de EtBr, para estes compostos encontram-se nas Figuras 22 a 25.

2,4-Dinitrofenol

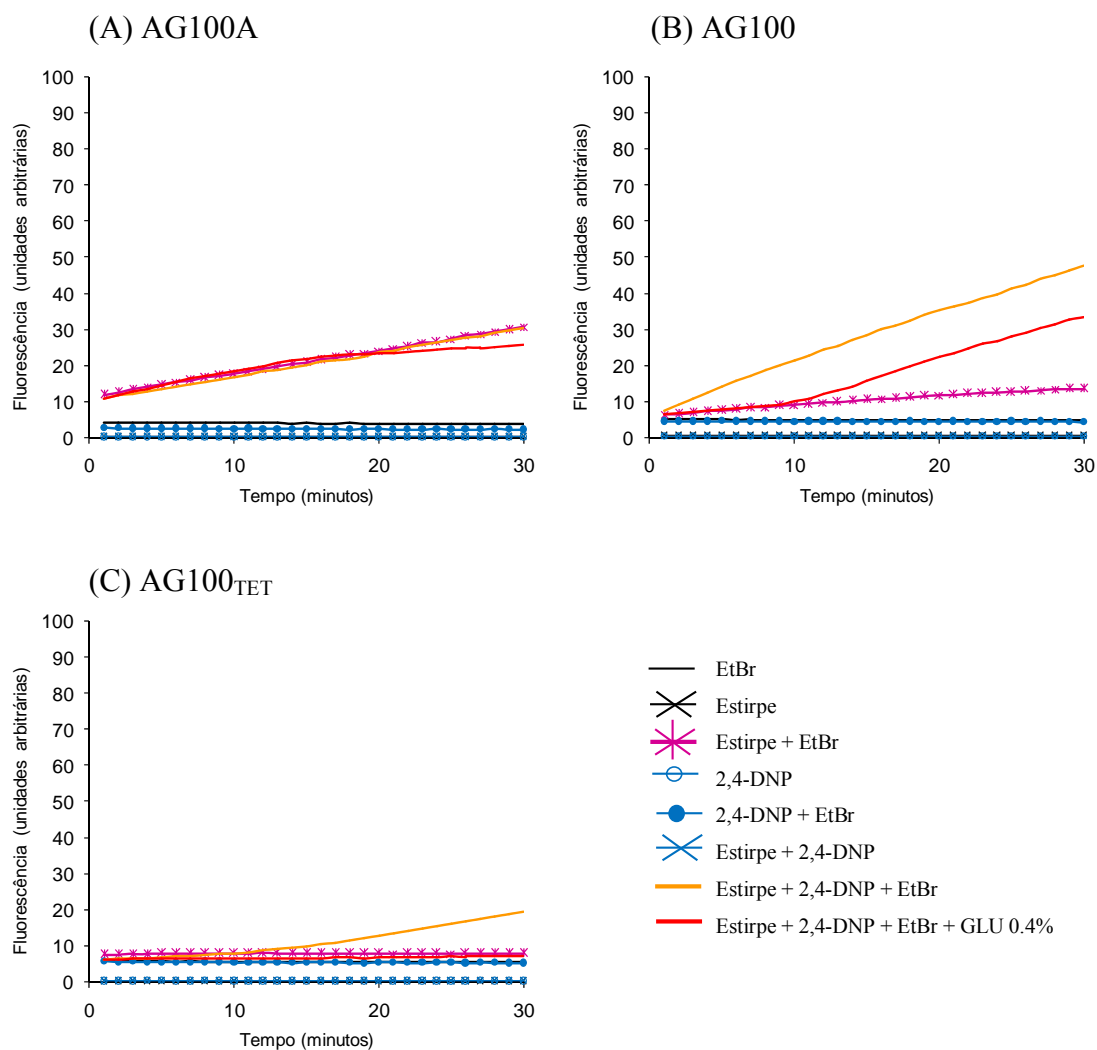


Figura 22 - Influência do 2,4-dinitrofenol na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C e pH 7, para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de 2,4-DNP a ½ da CMI (145mg/L para *E. coli* AG100 e AG100A, e 72,5mg/L para *E. coli* AG100_{TET}). Concentração de EtBr para *E. coli* AG100 e AG100_{TET} de 1 mg/L e concentração de EtBr de 0.5 mg/L para *E. coli* AG100A. Os vários controlos estão representados no gráfico.

Como se constata na Figura 22B, ensaio de acumulação para a estirpe AG100, na presença de glucose (GLU) linha a vermelho, em comparação com o ensaio sem GLU linha laranja, a diferença de fluorescência entre as duas curvas reflecte a capacidade de efluxo de EtBr que as células têm na presença de GLU. O atingir de valores de fluorescência diferentes, reflecte o efluxo de EtBr na curva de acumulação.

Dos gráficos apresentados na Figura 22, e de modo a facilitar a leitura e interpretação, podem-se destacar como resultados mais importantes os que se apresentam na Figura 23.

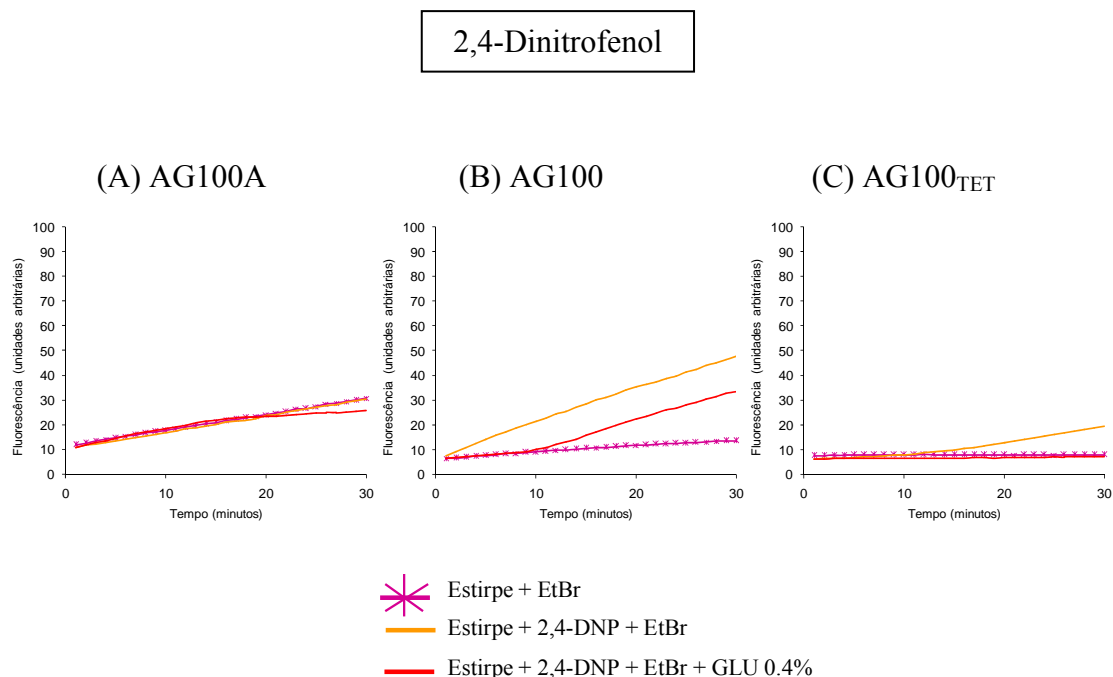


Figura 23 - Influência do 2,4-dinitrofenol na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C e pH 7, para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de 2,4-DNP a ½ da CMI. As concentrações de 2,4-DNP e de EtBr são as mesmas da figura anterior.

Para o composto 2,4-DNP, para a estirpe AG100 (estirpe selvagem) observa-se acumulação de EtBr na presença de 2,4-DNP e GLU, sendo essa acumulação mais significativa e mais rápida na ausência de GLU. Daqui se infere que a acção do 2,4-DNP é inibitória dos sistemas de efluxo de EtBr em *E. coli*, já que promovem a acumulação de EtBr nas células (aumento gradual da fluorescência relativa com o tempo) sendo a sua acção independente da presença de GLU como fonte de energia.

Para a estirpe AG100A (AcrAB-TolC inativado) observa-se um aumento gradual da acumulação de EtBr ao longo do tempo, o que pode ser interpretado pela ausência do AcrAB-TolC (curva estirpe + EtBr). Ao adicionar-se 2,4-DNP, não se observa qualquer efeito inibitório (*i.e.*, acumulação de EtBr nas células), tanto na ausência como na presença da GLU. Uma vez que na ausência de AcrAB-TolC continua a existir efluxo

de EtBr que garante o atingir de um equilíbrio entre a entrada e a saída de EtBr nas células da estirpe AG100A, demonstra-se que existem outros sistemas de efluxo, para além do AcrAB-TolC, que também bombeiam EtBr, resultado esperado e de acordo com a literatura (89, 126) e que estes sistemas vão ser inibidos pelo 2,4-DNP.

Para a estirpe AG100_{TET} (AcrAB-TolC sobreexpresso) apenas se observa acumulação de EtBr promovida pela presença do 2,4-DNP ao fim de 15 minutos e na ausência de GLU, o que indica que, para a potência de desacoplamento do 2,4-DNP e para a concentração utilizada, o efeito inibitório sobre o efluxo de EtBr é praticamente nulo dada a sobreexpressão do sistema AcrAB-TolC.

Destes resultados infere-se que o 2,4-DNP tem uma acção inibitória específica ou pelo menos direccionada sobre o sistema AcrAB-TolC, o qual se revela sensível a este composto quando avaliado pela sua capacidade de efluxar EtBr.

O composto CCCP foi o segundo desacoplador a ser testado, e os resultados obtidos através de ensaios de acumulação de EtBr pelo método fluorimétrico semi-automático, encontram-se nas Figuras 24 e 25. Dos resultados apresentados na Figura 24 destacam-se os mais importantes na Figura 25.

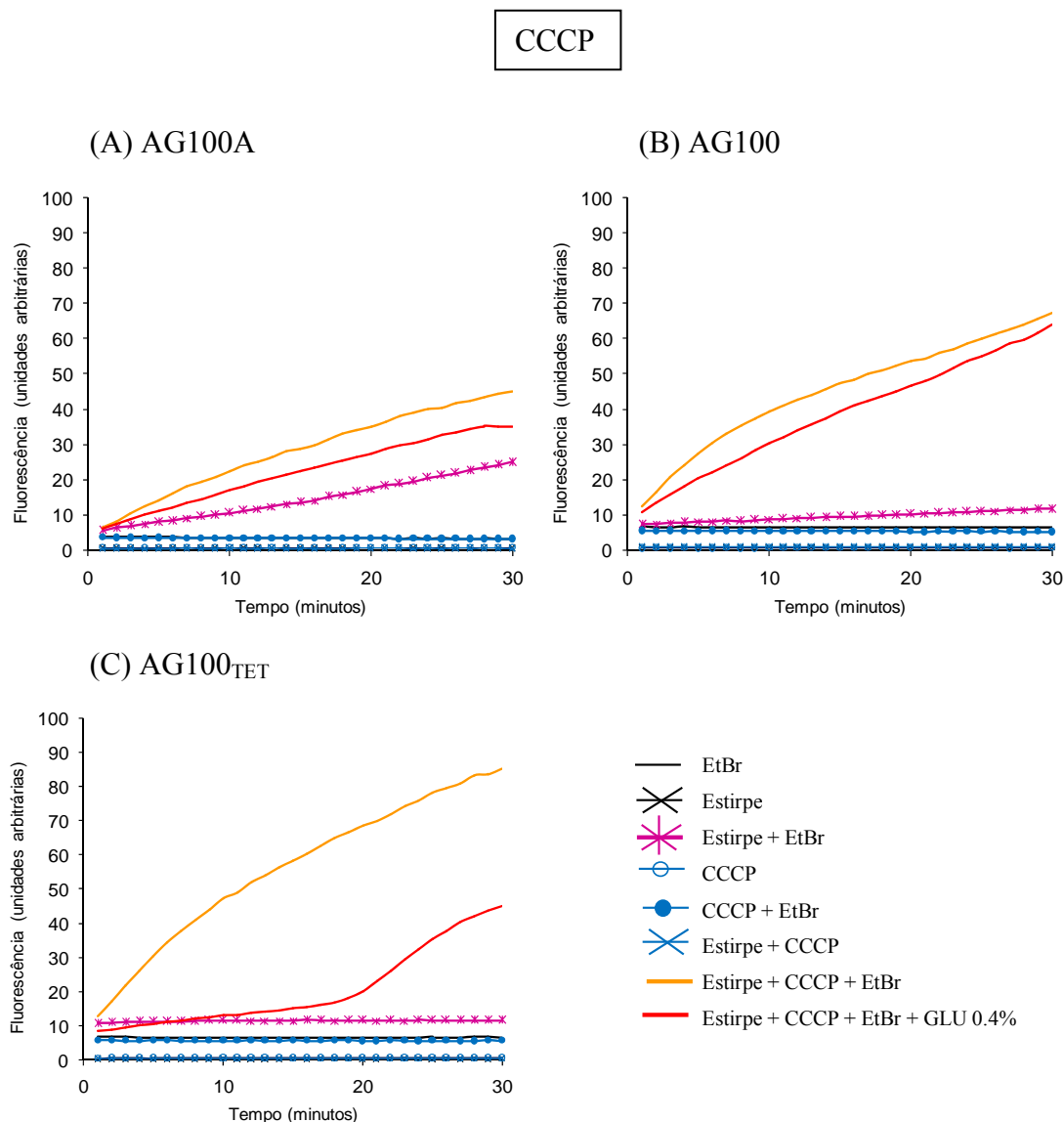


Figura 24 - Influência do CCCP na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C e pH 7, para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de CCCP a ½ da CMI (5mg/L para *E. coli* AG100 e AG100A, e 10mg/L para *E. coli* AG100_{TET}). Concentração de EtBr para *E. coli* AG100 e AG100_{TET} de 1 mg/L e concentração de EtBr de 0.5 mg/L para *E. coli* AG100A. Os vários controlos estão representados no gráfico.

CCCP

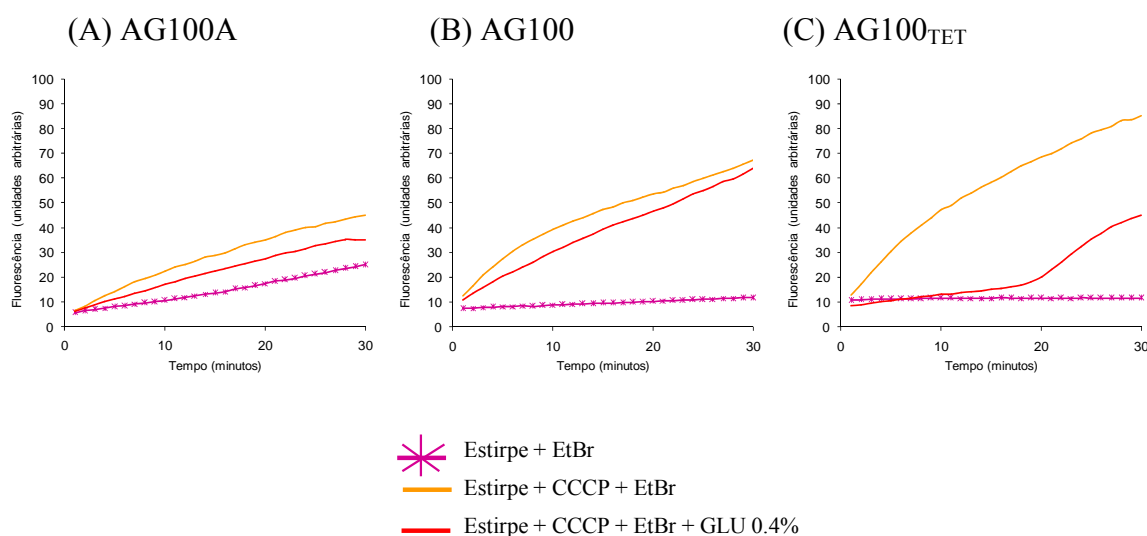


Figura 25 - Influência do CCCP na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C e pH 7, para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de CCCP a ½ da CMI. As concentrações de CCCP e de EtBr são as mesmas da figura anterior.

Para a análise destes resultados convém salientar que o CCCP é considerado 10 a 100 vezes mais potente como desacoplador da FPM do que o 2,4-DNP (28). Assim, observa-se o mesmo comportamento inibitório verificado para o 2,4-DNP, quando se analisa os resultados obtidos para as estirpes AG100 e AG100A, só que agora aumentado na sua potência, *i.e.*, verifica-se que há maior acumulação de EtBr na presença do CCCP do que na presença de 2,4-DNP. Dada a maior potência desacopladora do CCCP consegue-se agora promover alguma acumulação de EtBr pela AG100A, o que revela que as outras BE que estão a substituir a actividade do AcrAB-TolC também usam a FPM como fonte de energia, sendo a sua actividade pouco dependente da presença de uma fonte secundária de energia. Uma vez mais demonstrou-se que, o AcrAB-TolC não é o único sistema de efluxo a bombear EtBr em *E. coli*, pois há efluxo na estirpe AG100A.

No respeitante à análise da acumulação de EtBr promovida pelo CCCP na estirpe AG100_{TET} (AcrAB-TolC sobreexpresso) verifica-se que o efeito inibitório do efluxo é acentuado na ausência da GLU, o que demonstra a importância da FPM e do sistema

AcrAB-TolC no efluxo de EtBr em *E. coli*, revelando que o CCCP é um potente inibidor de bombas da família RND que usam a FPM, tal como o AcrAB-TolC (121). Assim, a GLU como fonte de energia, estimula a produção/manutenção da FPM pelo acoplamento com a produção protónica pelas ATPases, o que contraria a acção inibitória por dissipação e desacoplamento do potencial protónico do CCCP, sobretudo na AG100_{TET} onde este efeito é exacerbadado pelo elevado número de cópias do sistema AcrAB-TolC que estão a operar na dependência da FPM (126, 130).

Da análise combinada dos resultados obtidos para o 2,4-DNP e o CCCP, estes indicam uma clara susceptibilidade do sistema AcrAB-TolC à dissipação da FPM, quando avaliado pela capacidade de efluxar EtBr, um substrato que é tido como sendo de sua eleição para o transporte (82, 89). Assim, confirma-se que a metodologia e tecnologia de análise, propostas neste trabalho, são adequadas para avaliar experimentalmente os requisitos bioenergéticos do efluxo de EtBr em *E. coli*.

Destes resultados ressalta a importância que a manutenção da FPM tem para a eficiente actividade do sistema AcrAB-TolC e consequentemente para o efluxo de EtBr em *E. coli*, pelo que se coloca agora a questão do que acontecerá se em vez de se inibir directamente a FPM por dissipação directa do potencial protónico, se inibir a acção das ATPases que o garantem.

3.2.3. Influência de Inibidores de ATPases membranares na acumulação de EtBr

Os inibidores de ATPase utilizados neste trabalho foram a azida de sódio e o ortovanadato de sódio, tendo sido os ensaios efectuados em triplicado e de acordo com o protocolo anteriormente descrito (vide capítulo Material e Métodos, secção 2.2.4.1.). Os inibidores foram adicionados imediatamente antes das leituras no Rotor-GeneTM 3000. As concentrações utilizadas correspondem a 1/2 CMI para cada uma das estirpes em estudo e na Figura 26 encontram-se os gráficos de acumulação na presença e ausência de azida de sódio para cada uma das três estirpes testadas.

Azida de Sódio

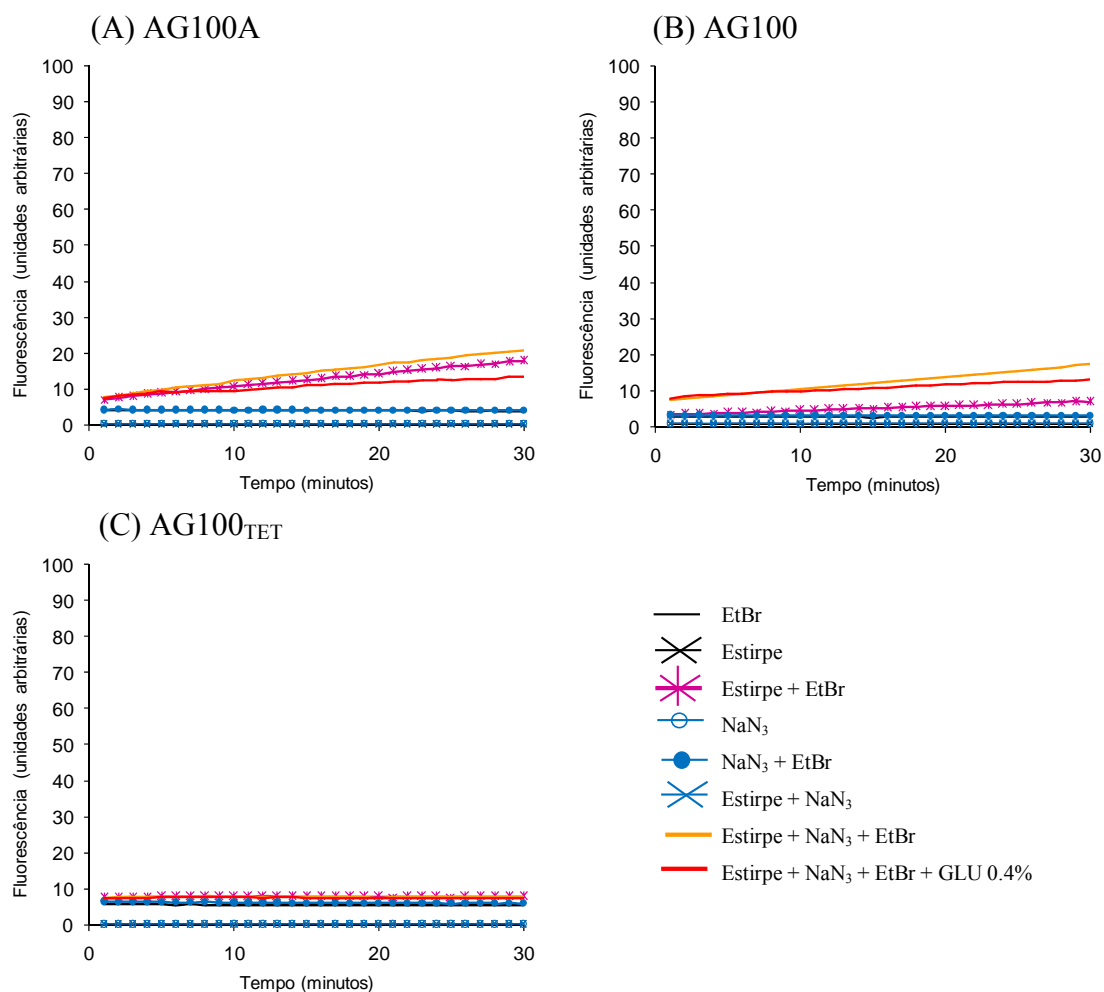


Figura 26 - Influência da azida de sódio na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C e pH 7, para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de NaN₃ a ½ da CMI (115mg/L para *E. coli* AG100, AG100A, e AG100_{TET}). Concentração de EtBr para *E. coli* AG100 e AG100_{TET} de 1 mg/L e concentração de EtBr de 0.5 mg/L para *E. coli* AG100A. Os vários controles estão representados no gráfico.

Dos gráficos apresentados na Figura 26, podem-se destacar como resultados mais importantes os que se apresentam na Figura 27.

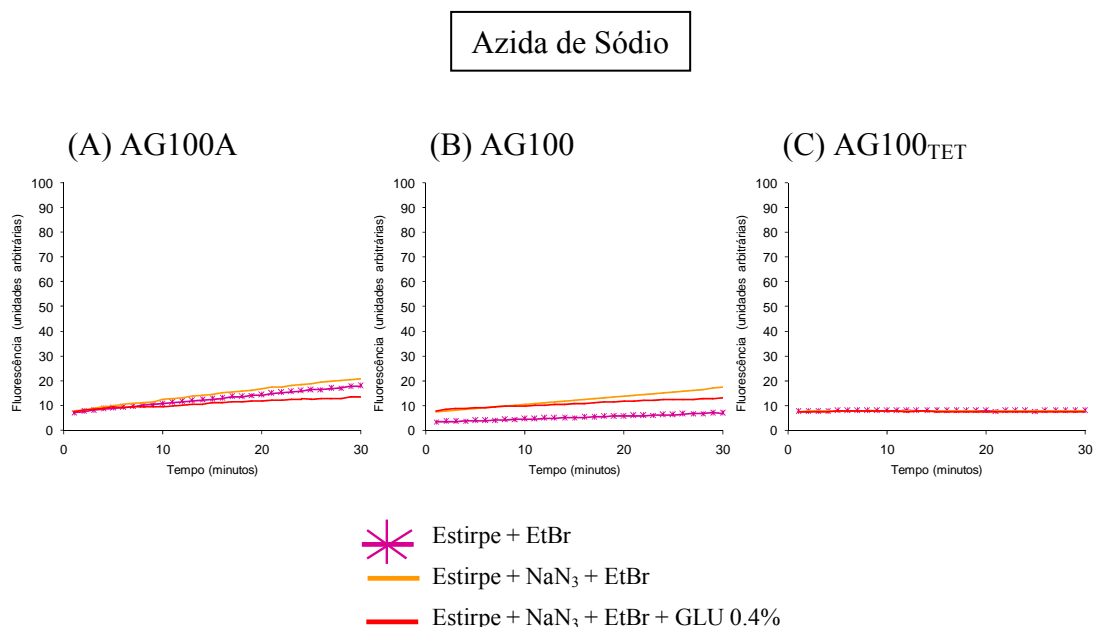


Figura 27 - Influência da azida de sódio na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C e pH 7, para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de NaN₃ a ½ da CMI. As concentrações de NaN₃ e de EtBr são as mesmas da figura anterior.

Para as três estirpes em estudo, na presença de azida de sódio, e comparando com o controlo da estirpe na presença apenas de EtBr, não se observa aumento significativo da acumulação de EtBr na presença de composto, sendo as curvas de acumulação praticamente sobrepostas ao longo do tempo. Para a estirpe AG100_{TET} não se observa acumulação de EtBr, o que indica uma total incapacidade da actividade inibitória da azida de sódio sobre o sistema AcrAB-TolC sobreexpresso nesta estirpe.

A azida de sódio foi descrita como sendo um inibidor preferencial das V-ATPases (H⁺-ATPases vacuolares típicas dos eucariotas), que uma vez inibidas não conseguem manter o potencial de membrana, dada a diminuição do transporte de protões para o meio extracelular, o que conduz à redução da FPM (48, 132, 141). Contudo, foi

igualmente reportado que a actividade enzimática da F_1F_0 -ATPase é também inibida, em menor escala pela azida, bem como outras ATPases são parcialmente inibidas pela azida, tais como os transportadores ABC, a translocase SecA e a DNA topoisomerase II α (13, 133).

Não existindo um grande número de V-ATPases ao nível das membranas citoplasmáticas procariotas, estes resultados enquadram-se na hipótese de que, a FPM que garante o funcionamento das BE da família RND como a AcrAB-TolC, provém sobretudo do acoplamento com as F-ATPases membranares e as P-ATPases, compreendendo-se por isso que a azida de sódio não tenha uma acção inibitória significativa sobre a actividade do sistema AcrAB-TolC no efluxo de EtBr em *E. coli*.

Nas Figuras 28 e 29 encontram-se os resultados obtidos para o composto ortovanadato de sódio.

Ortovanadato de Sódio

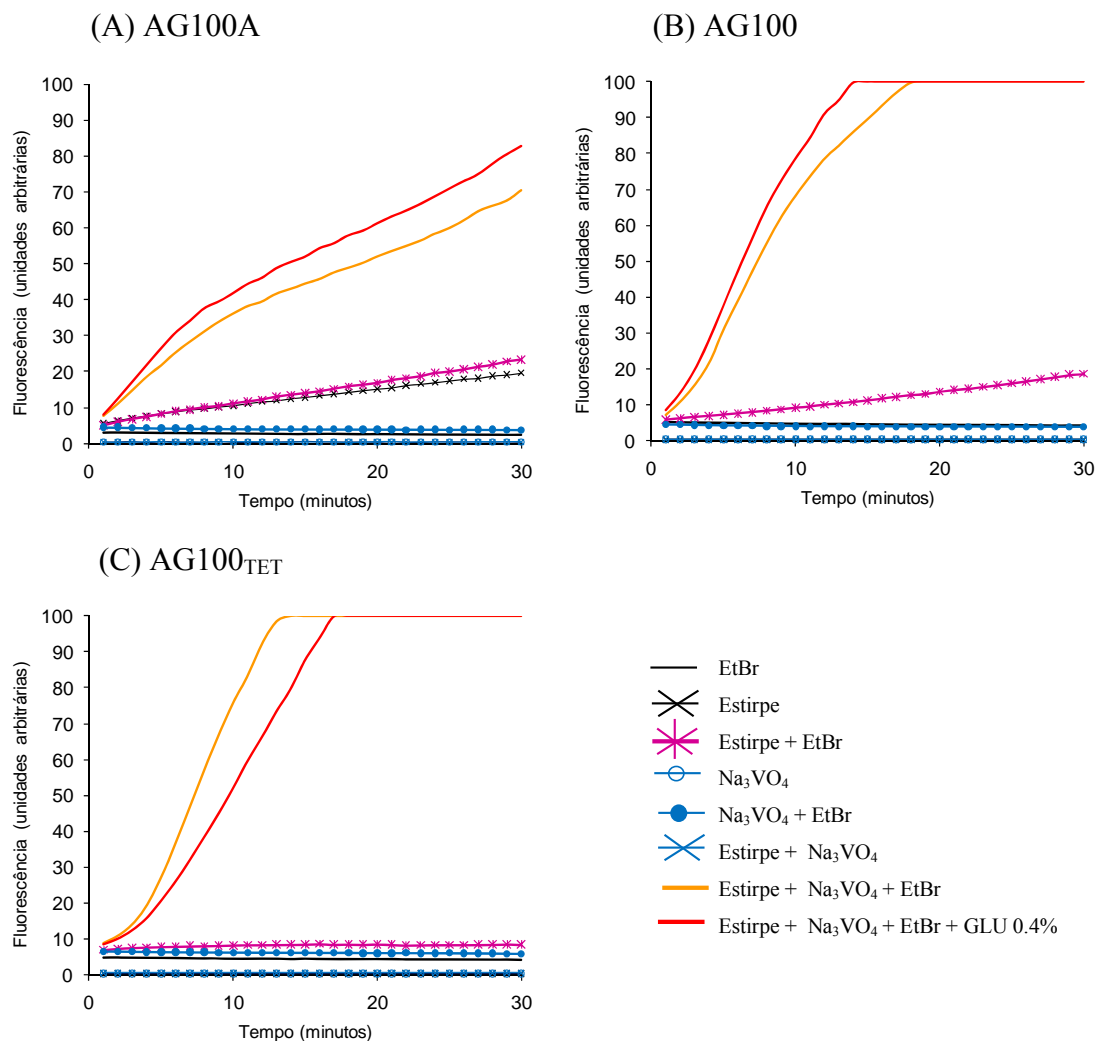


Figura 28 - Influência do ortovanadato de sódio na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C e pH 7, para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de Na₃VO₄ a ½ da CMI (2500mg/L para *E. coli* AG100 e AG100A, e 1250mg/L para *E. coli* AG100_{TET}). Concentração de EtBr para *E. coli* AG100 e AG100_{TET} de 1 mg/L e concentração de EtBr de 0.5 mg/L para *E. coli* AG100A. Os vários controlos estão representados no gráfico.

Dos gráficos apresentados na Figura 28, podem-se destacar como resultados mais importantes os que se apresentam na Figura 29.

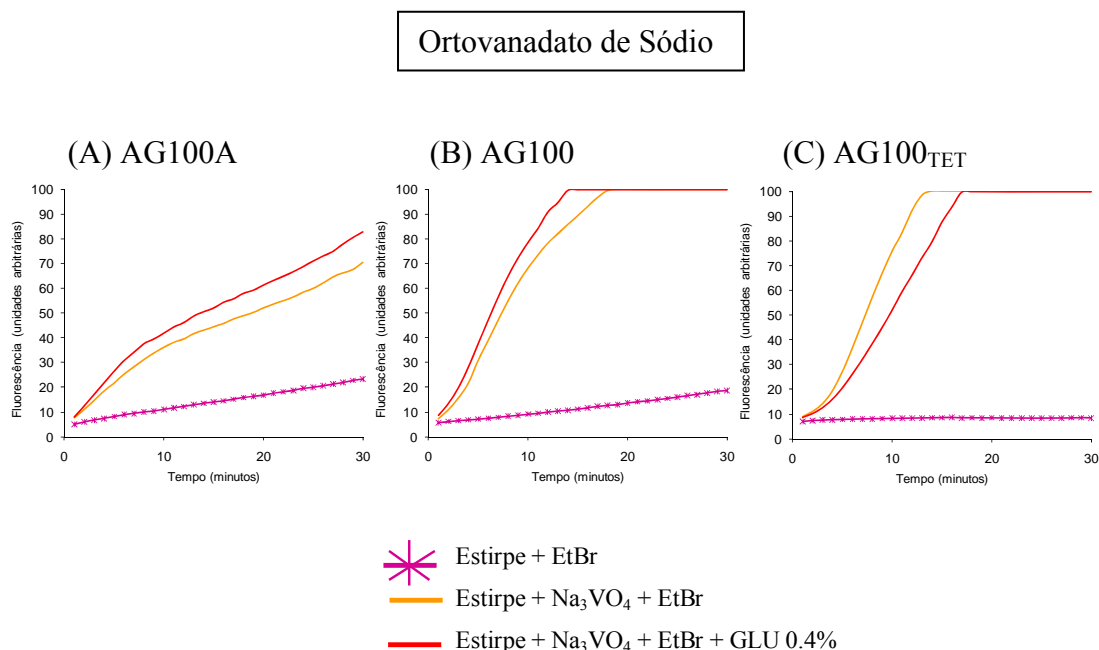


Figura 29 - Influência do ortovanadato de sódio na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C e pH 7, para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de Na₃VO₄ a 1/2 da CMI. As concentrações de Na₃VO₄ e de EtBr são as mesmas da figura anterior.

Para as três estirpes em estudo, comparativamente ao controlo da estirpe somente com EtBr, observa-se que na presença do composto ortovanadato de sódio, há uma forte acção inibitória do efluxo que promove uma grande acumulação de EtBr nas células. Para a concentração utilizada, verifica-se que a presença de GLU não altera significativamente a acumulação de EtBr pelas células, o que evidencia o potencial inibitório deste composto.

Devido ao facto de ser um composto com um resultado tão evidente a 1/2 da CMI, e sendo a CMI para este composto bastante elevada (5000 mg/L), tal significa que mesmo na presença de uma grande concentração de composto, a célula continua a multiplicar-se normalmente, não sendo por isso um efeito inibitório letal. Tal evidencia que este composto é específico das ATPases não essenciais envolvidas no transporte de iões a

nível membranar. Por outro lado, e uma vez que relativamente à acumulação de EtBr na presença de Na_3VO_4 , se observam os mesmos resultados para todas as estirpes, inclusive para a AG100A, que tem o sistema de efluxo AcrAB-TolC inactivado, logo a inibição não é específica do sistema AcrAB-TolC, mas sim de todas as BE que usam a energia proveniente da FPM acoplada às ATPases inibidas por este composto. Na mesma linha de raciocínio e para a estirpe AG100_{TET}, que tem o principal sistema de efluxo AcrAB-TolC sobre-expresso, observa-se uma acumulação significativa de EtBr na presença de ortovanadato de sódio, comparando com o controlo sem composto, atingindo um máximo de acumulação ao fim de 15 minutos. Igualmente a GLU, como fonte de energia alternativa, tem pouca capacidade para alterar/superar o efeito do ortovanadato de sódio, pois a inibição com este composto é tão forte, que mesmo com GLU não se consegue superar esta inibição, uma vez que a ligação entre a produção de ATP ao nível das vias metabólicas e a sua utilização para gerar FPM para as BE encontra-se bloqueada.

Sendo o ortovanadato de sódio um inibidor preferencial de F- e P-ATPases (13, 78, 133), verifica-se que, na presença deste composto, há inibição das BE dependentes da FPM sem ser afectado directamente o metabolismo celular o que o coloca como um excelente candidato a adjuvante de quimioterapia por inibição do efluxo de agentes quimioterapêuticos ao mesmo nível que outros compostos, também tidos como inibidores de ATPases de translocação iónica (P-ATPases), como as fenotiazinas (2, 68, 128).

3.2.4. Influência de compostos que inibem os canais de cálcio na acumulação de EtBr

Como compostos inibidores dos canais de cálcio, e consequentemente inibidores das ATPases dependentes dos canais de cálcio, utilizaram-se os compostos clorpromazina (CPZ) e tioridazina (TZ), ambos do grupo das fenotiazinas.

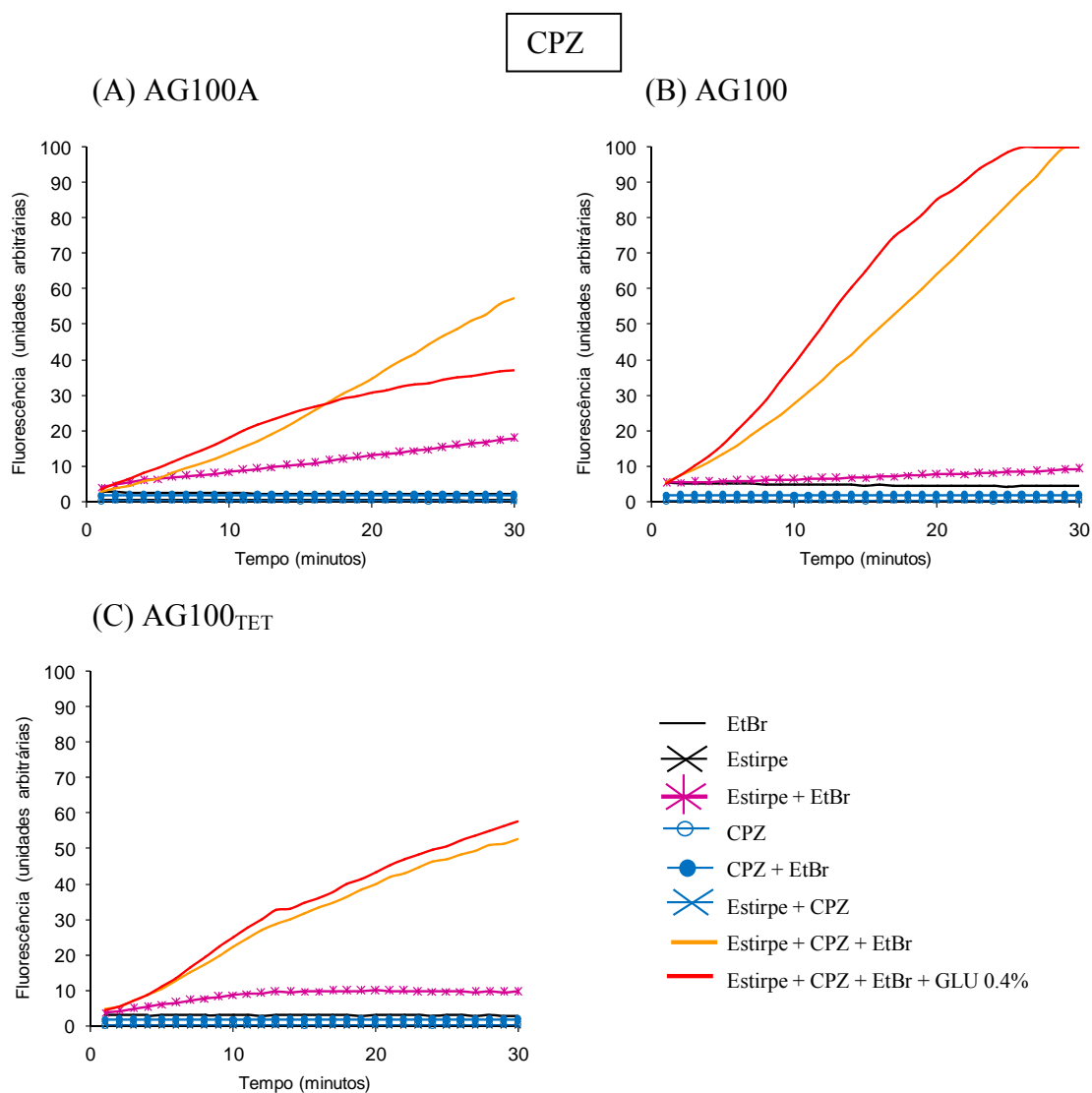


Figura 30 - Influência da Clorpromazina na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C e pH 7, para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de CPZ a ½ da CMI (30mg/L para *E. coli* AG100, 10mg/L para *E. coli* AG100A, e 70mg/L para *E. coli* AG100_{TET}). Concentração de EtBr para *E. coli* AG100 e AG100_{TET} de 1 mg/L e concentração de EtBr de 0.5 mg/L para *E. coli* AG100A. Os vários controlos estão representados no gráfico.

Dos gráficos apresentados na Figura 30, podem-se destacar como resultados mais importantes os que se apresentam na Figura 31.

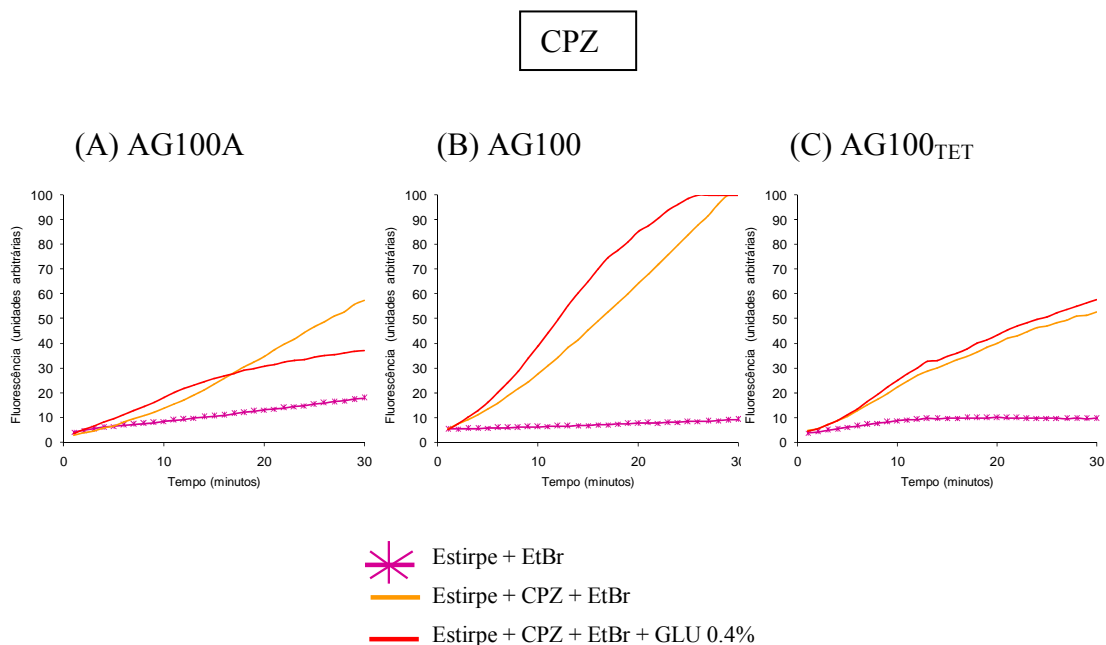


Figura 31 - Influência da Clorpromazina na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C, e pH 7 para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de CPZ a ½ da CMI. As concentrações de CPZ e de EtBr são as mesmas da figura anterior.

Para as três estirpes em estudo, e comparativamente ao controlo da estirpe somente com EtBr, observa-se acumulação significativa de EtBr na presença de CPZ, atingindo-se um valor máximo aos 30 minutos de acumulação para a estirpe selvagem.

Nas Figuras 32 e 33 encontram-se os resultados obtidos com a tioridazina (TZ).

TZ

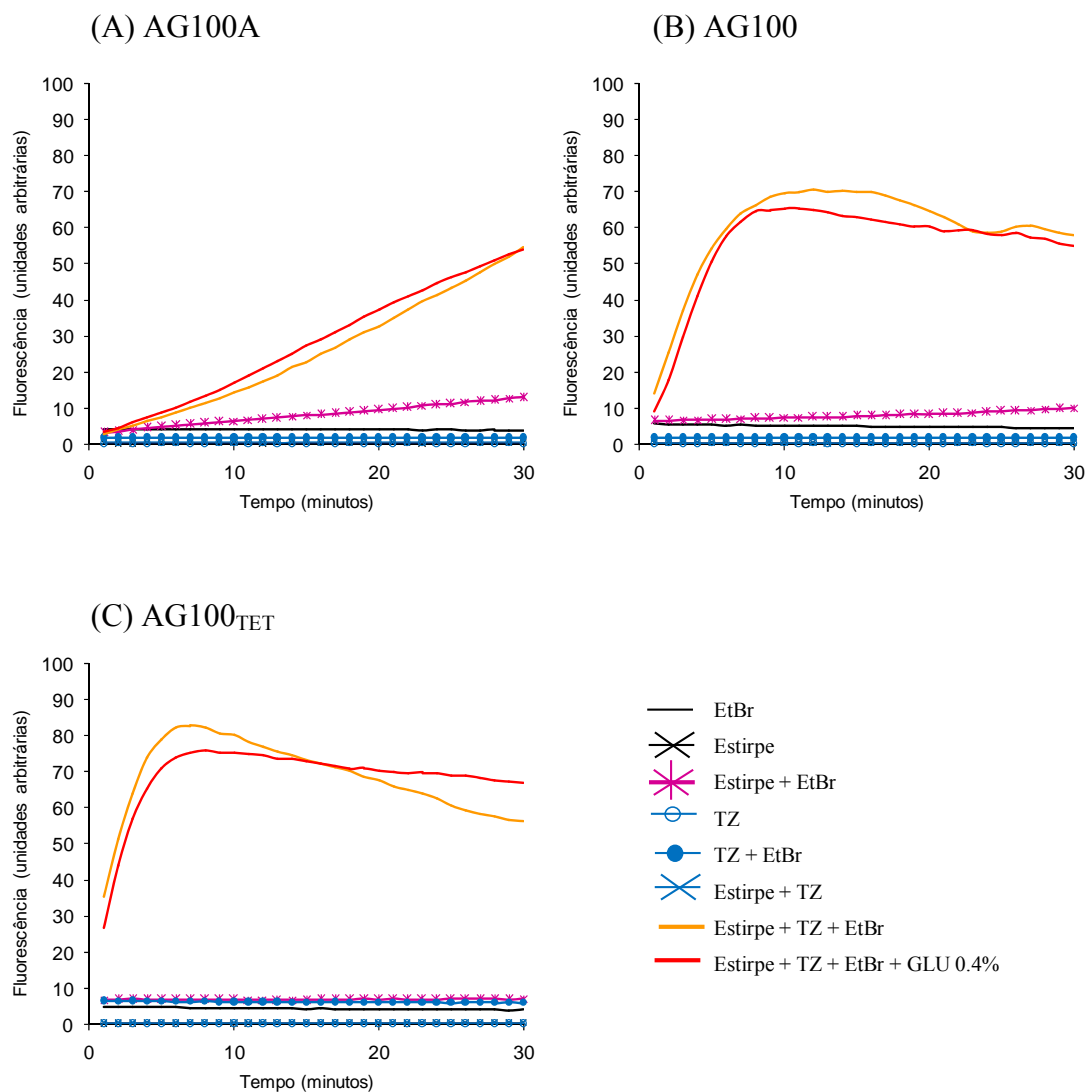


Figura 32 - Influência da Tioridazina na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C e pH 7, para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de TZ a ½ da CMI (50mg/L para *E. coli* AG100, 12,5mg/L para *E. coli* AG100A, e 100mg/L para *E. coli* AG100_{TET}). Concentração de EtBr para *E. coli* AG100 e AG100_{TET} de 1 mg/L e concentração de EtBr de 0.5 mg/L para *E. coli* AG100A. Os vários controlos estão representados no gráfico.

Dos gráficos apresentados na Figura 32, podem-se destacar como resultados mais importantes os que se apresentam na Figura 33.

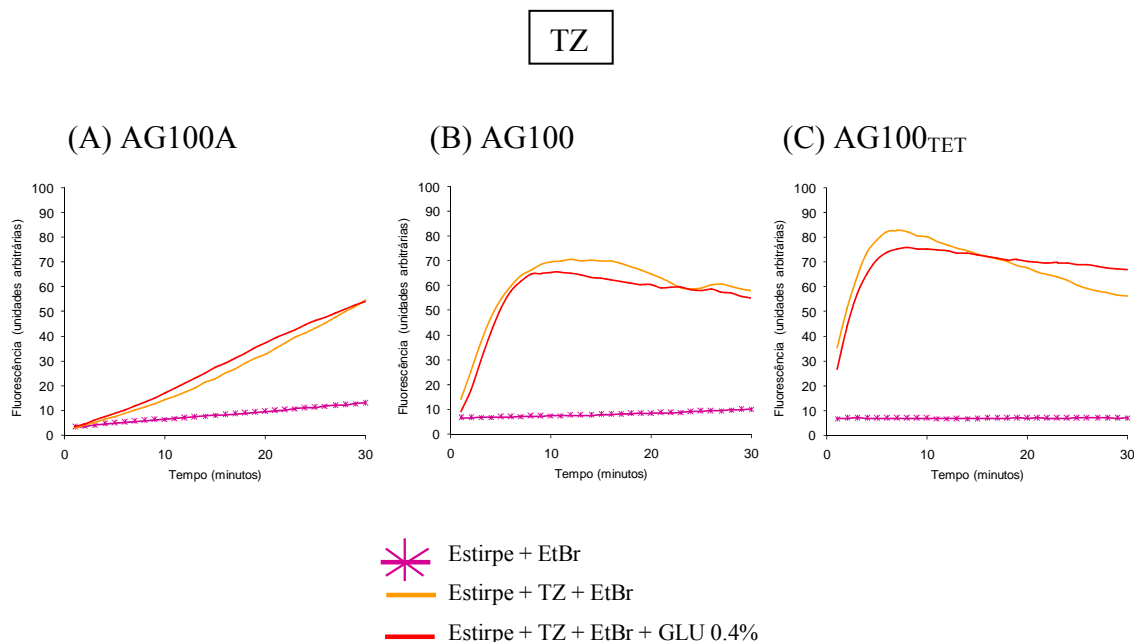


Figura 33 - Influência da Tioridazina na acumulação de EtBr.

Ensaio de acumulação de EtBr, durante um período de 30 minutos, a 37°C e pH 7, para as estirpes *E. coli* (A) AG100A, (B) AG100 e (C) AG100_{TET}, na presença e ausência de GLU, e na presença de TZ a ½ da CMI. As concentrações de TZ e de EtBr são as mesmas da figura anterior.

Na presença do composto TZ, as estirpes AG100 e AG100_{TET} na presença e na ausência de GLU, acumulam EtBr até um valor máximo de fluorescência ao fim de 10 minutos, de 70 e 80 unidades relativas de fluorescência, respectivamente, e a partir desse momento as células começam a efluxar EtBr, superando o efeito inibitório da TZ. Com base nestes resultados, há que considerar a hipótese de o sistema AcrAB-TolC ter vias alternativas, para superar a inibição provocada pela TZ pois, para a estirpe AG100A, não se observa esse fenómeno, observando-se apenas acumulação de EtBr nas mesmas condições experimentais. Para ambas as fenotiazinas testadas, a presença de GLU não alterou a acumulação de EtBr em qualquer uma das estirpes. Os inibidores dos canais de cálcio não vêm o seu efeito afectado pela GLU, tal como os restantes inibidores de ATPases testados.

3.3. Influência de diversos inibidores na acumulação de EtBr a pH 5, pH 7 e pH 8

Do conjunto dos resultados anteriores, tornou-se evidente a dependência do efluxo de EtBr em *E.coli* da existência e manutenção da FPM, sendo que, os compostos que melhores efeitos evidenciaram, foram aqueles que promovem a dissipação do potencial protónico (desacopladores) e os inibidores das F e P-ATPases bacterianas (ortovanadato de sódio e fenotiazinas), que garantem a manutenção da FPM. Os efeitos anteriormente postos em evidência foram observados a pH fisiológico (pH 7). Se as hipóteses anteriormente avançadas forem válidas, então a avaliação do efeito destes mesmos compostos na acumulação de EtBr também a pH 5 e a pH 8, na presença e ausência de GLU, irá colocar em evidência, a dependência do transporte de EtBr em *E. coli* do gradiente electroquímico transmembranar, com os seus dois componentes: um gradiente de protões que promove uma diferença de pH (ΔpH) e uma diferença na carga iónica ou potencial de membrana ($\Delta\psi$) devido à distribuição desigual de cargas, os dois componentes da FPM (15).

Ao testarmos a acumulação de EtBr a diferentes pH, podemos observar diferentes resultados conforme a quantidade de protões que estão disponíveis no meio extracelular, pois a célula bacteriana utiliza os protões como antiporte para as BE, as ATPases e a própria FPM, esperando-se que a pH baixo (elevada concentração de hidrogeniões no meio extracelular) o efeito dos inibidores anteriormente identificados seja diminuído quando em comparação com os resultados a pH 7. Ao invés, espera-se uma exacerbação dos efeitos inibitórios a pH alto (baixa concentração de hidrogeniões no meio extracelular).

Para este efeito seleccionou-se o desacoplador, o inibidor das ATPases membranares e o inibidor dos canais de cálcio que melhores resultados inibitórios apresentaram nas secções anteriores, nomeadamente o CCCP, o Na_3VO_4 e o CPZ.

3.3.1. Influência do desacoplador CCCP na acumulação de EtBr a pH 5, pH 7 e pH 8

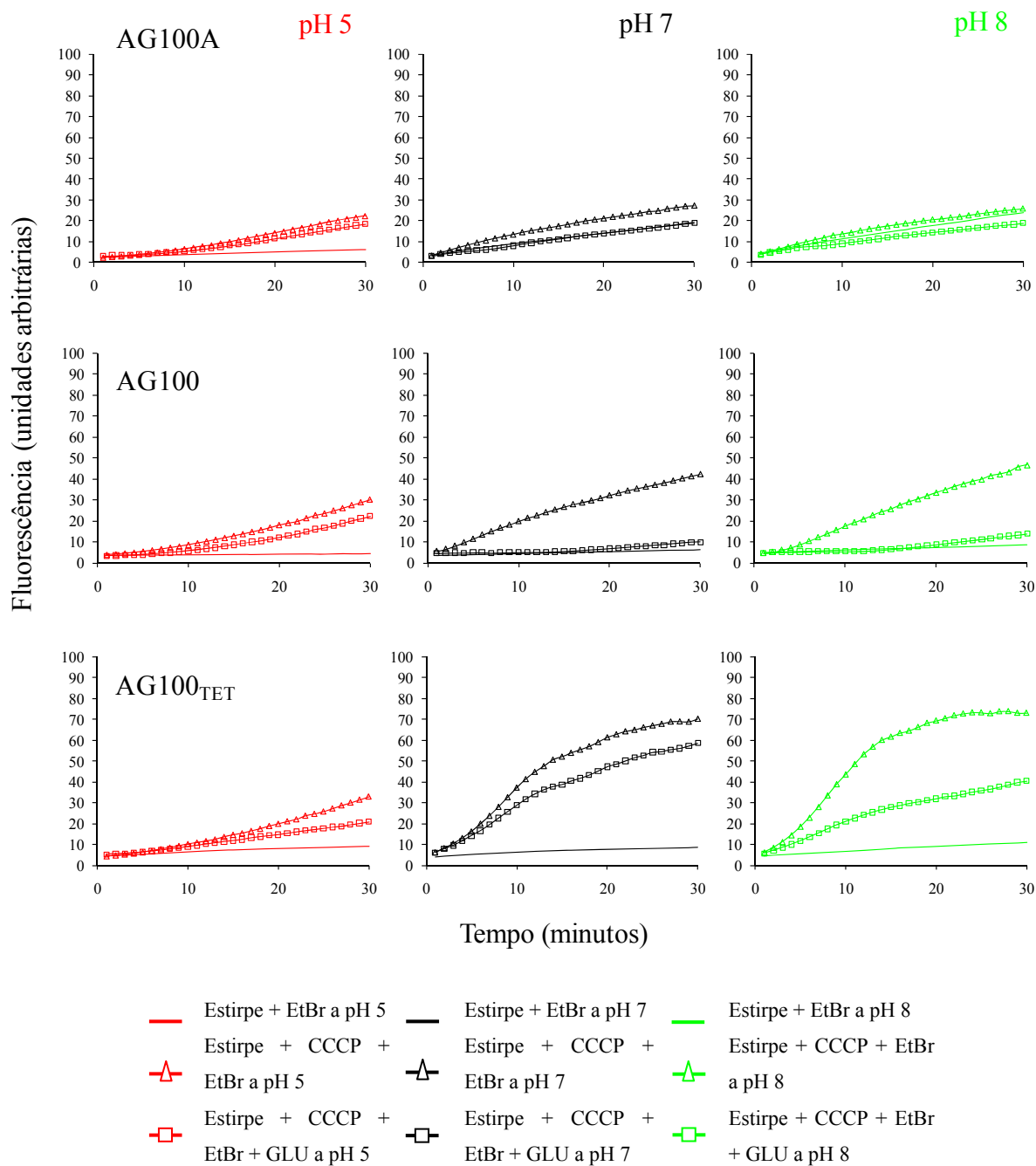


Figura 34 - Influência do pH na acumulação de EtBr na presença de CCCP.

Ensaio de acumulação de EtBr pelas estirpes *E. coli* AG100, AG100A e AG100_{TET}, em meios a pH 5, 7 e 8, durante um período de 30 minutos, a 37°C, na presença e ausência de GLU, e na presença de CCCP a ½ da CMI (5mg/L para *E. coli* AG100 e AG100A, e 10mg/L para *E. coli* AG100_{TET}). Concentração de EtBr para *E. coli* AG100 e AG100_{TET} de 1 mg/L e concentração de EtBr de 0.5 mg/L para *E. coli* AG100A.

Relativamente ao controlo (estirpe na presença de EtBr), observa-se para todas as estirpes, maior acumulação de EtBr a pH 8, menor a pH 7 e ainda menor a pH 5. Em todas as estirpes observa-se que a presença de GLU diminui a acumulação de EtBr, sendo esta diminuição claramente evidente a pH 8 para as estirpes AG100 e AG100_{TET} (Figura 34).

A pH 5 a contribuição de protões para a FPM é significativamente maior do que a pH 8. Num ambiente rico em protões (pH 5), o efeito de dissipação do potencial protónico causado pelo CCCP sobre a acumulação de EtBr é rapidamente suprimido, sendo a FPM rapidamente restabelecida, sem necessidade de recurso à geração de novos protões por consumo de GLU e activação das ATPases, ou seja, a pH 5 a presença ou ausência de GLU praticamente não tem influência independentemente da estirpe testada (Figura 34 - Gráficos a vermelho). A demonstração do efeito do CCCP na actividade de um sistema de efluxo pode ser melhor evidenciado a pH superior a 7 tal como já havia sido demonstrado para células eucariotas (110).

Num ambiente com escassez em protões (pH 8), o efeito de dissipação do potencial protónico causado pelo CCCP sobre a acumulação de EtBr é lentamente suprimido na ausência de GLU, o que claramente promove a acumulação de EtBr, mesmo na estirpe com sobreexpressão de AcrAB-TolC (AG100_{TET}). Uma vez que seja fornecida GLU ao meio, a glicólise é activada bem como as ATPases, as quais vão gerar uma maior disponibilidade de protões, para o restabelecimento do potencial protónico, que garante o retomar do efluxo de EtBr pelo sistema AcrAB-TolC. Assim, a pH 8 a presença de GLU tem grande influência no restabelecimento do efluxo de EtBr pelas estirpes AG100 e AG100_{TET} mas não pela estirpe AG100A (Figura 34 - Gráficos a verde). Uma vez mais se conclui que, as outras BE que substituem o sistema AcrAB-TolC no efluxo de EtBr na estirpe AG100A, não recorrem a FPM para actuar, não sendo afectadas pela dissipação causada pela presença do desacoplador CCCP, nem pela presença ou ausência de GLU, a qualquer um dos três pH testados. São provavelmente dependentes da energia gerada directamente pela hidrólise do ATP do tipo ABC.

3.3.2. Influência de inibidores de ATPase na acumulação de EtBr a pH 5, pH 7 e pH 8

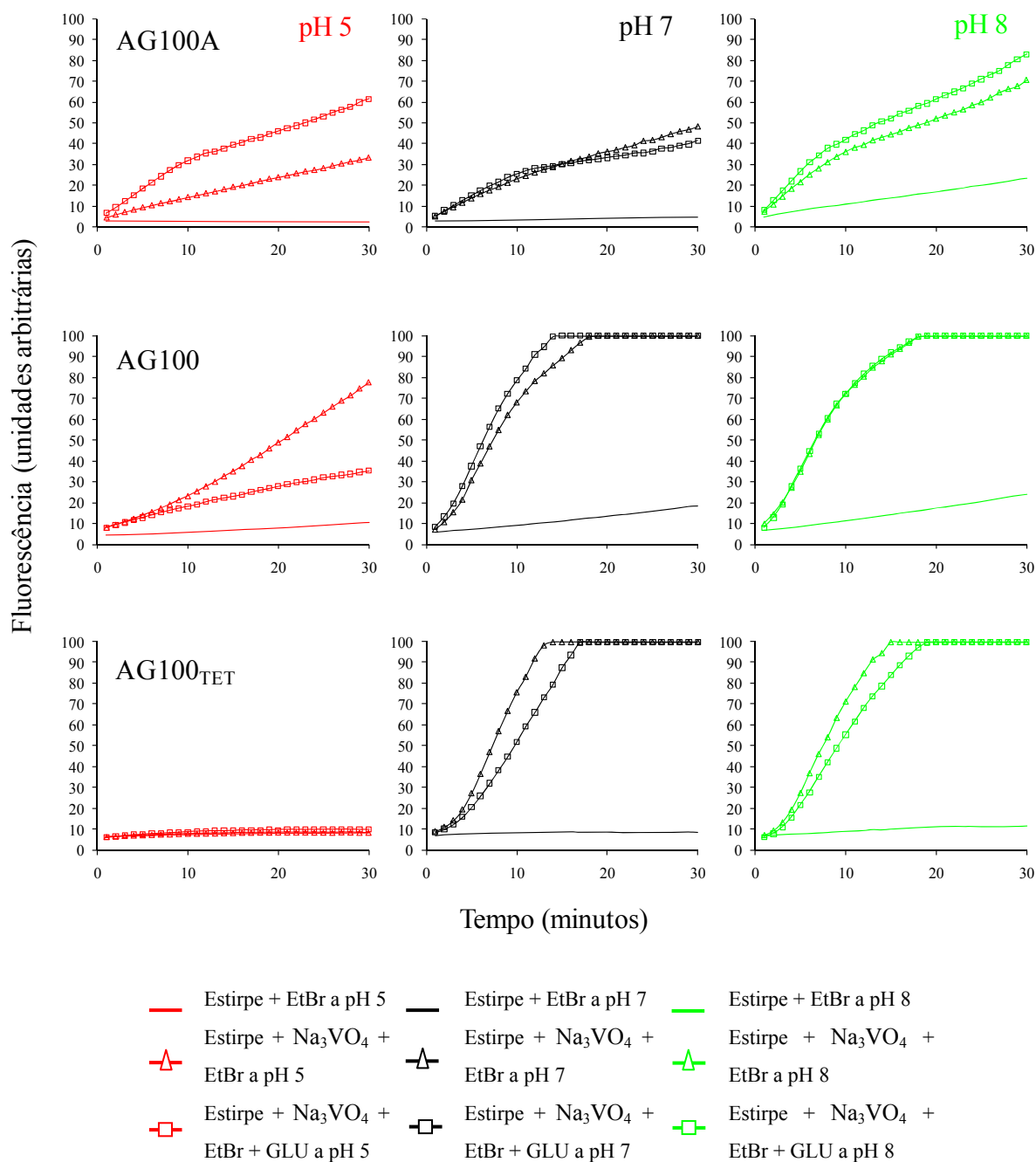


Figura 35 - Influência do pH na acumulação de EtBr na presença de ortovanadato de sódio.

Ensaio de acumulação de EtBr pelas estirpes *E. coli* AG100, AG100A e AG100_{TET}, em meios a pH 5, 7 e 8, durante um período de 30 minutos, a 37°C, na presença e ausência de GLU, e na presença de Na₃VO₄ a ½ da CMI (2500mg/L para *E. coli* AG100 e AG100A, e 1250mg/L para *E. coli* AG100_{TET}). Concentração de EtBr para *E. coli* AG100 e AG100_{TET} de 1 mg/L e concentração de EtBr de 0.5 mg/L para *E. coli* AG100A.

Relativamente ao controlo (estirpe na presença de EtBr), observa-se para todas as estirpes, maior acumulação de EtBr a pH 8, menor a pH 7 e ainda menor a pH 5 (Figura 35).

Num ambiente rico em protões (pH 5), o efeito de inibição das ATPases membranares causado pelo Na_3VO_4 que conduz a um aumento da acumulação de EtBr, é diminuído, sendo a FPM restabelecida com maior facilidade, se for possível o recurso à geração de novos protões por consumo de GLU e reactivação das ATPases, ou seja, a pH 5 a presença de GLU tem grande influência no retomar do efluxo de EtBr pelo sistema AcrAB-TolC e pelos sistemas que o substituem na estirpe AG100A, bem como a capacidade de efluxo de EtBr é mantida com maior facilidade mesmo na presença de Na_3VO_4 (Figura 35 - Gráficos a vermelho). De notar que para a estirpe AG100_{TET}, com o sistema AcrAB-TolC sobreexpresso, a presença de um ambiente rico em protões anula completamente o efeito do IBE demonstrando uma vez mais a dependência do sistema AcrAB-TolC da FPM para actuar.

Num ambiente com escassez em protões (pH 8), o efeito de inibição das ATPases membranares causado pelo Na_3VO_4 é aumentado, não sendo suprimido ou diminuído mesmo na presença de GLU, o que claramente promove a acumulação de EtBr, mesmo na estirpe com sobreexpressão de AcrAB-TolC (AG100_{TET}). Assim, a pH 8 a presença de GLU não tem influência no restabelecimento do efluxo de EtBr, em qualquer das estirpes inibidas pelo Na_3VO_4 uma vez que a fonte geradora de FPM e consequentemente de possível reestabelecimento de protões no meio extracelular está inactivada, mesmo que se estimule a célula com GLU (Figura 35 - Gráficos a verde). No caso da estirpe AG100A, a inactivação das BE do tipo ABC (que se crê estarem a substituir o sistema AcrAB-TolC como anteriormente postulado) é directa e significativa, uma vez que estas bombas dependem directamente das ATPases membranares para poderem operar e como tal a presença ou ausência de GLU não faz grande diferença e estas bombas que são altamente sensíveis a estes inibidores (97).

3.3.3. Influência do inibidor de canais de cálcio CPZ na acumulação de EtBr a pH 5, pH 7 e pH 8

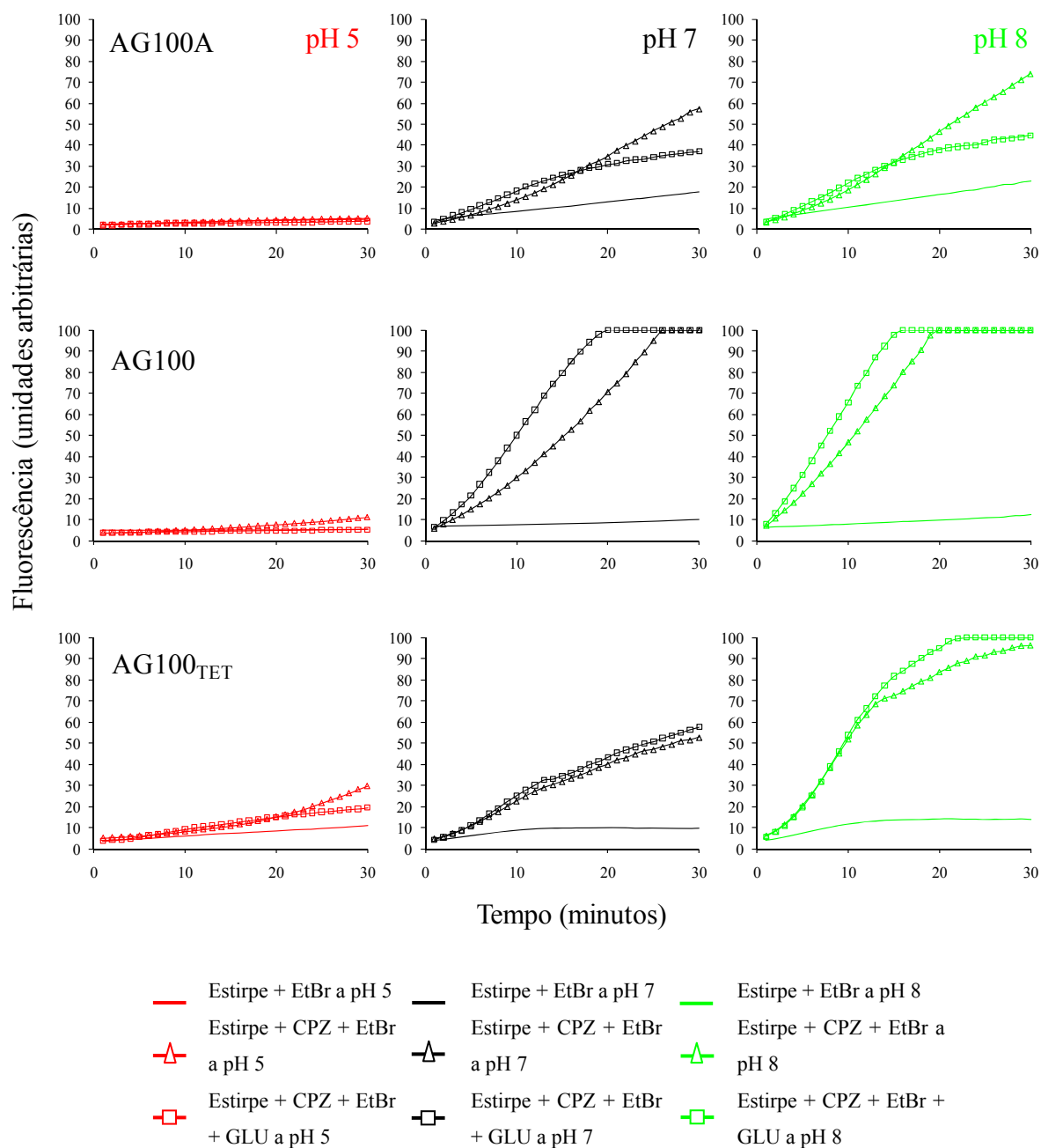


Figura 36 - Influência do pH na acumulação de EtBr na presença de Clorpromazina.

Ensaio de acumulação de EtBr pelas estirpes *E. coli* AG100, AG100A e AG100_{TET}, em meios a pH 5, 7 e 8, durante um período de 30 minutos, a 37°C, na presença e ausência de GLU, e na presença de CPZ a ½ da CMI (30mg/L para *E. coli* AG100, 10mg/L para *E. coli* AG100A, e 70mg/L para *E. coli* AG100_{TET}). Concentração de EtBr para *E. coli* AG100 e AG100_{TET} de 1 mg/L e concentração de EtBr de 0.5 mg/L para *E. coli* AG100A.

Relativamente ao controlo (estirpe na presença de EtBr), observa-se para todas as estirpes, maior acumulação a pH 8, menor a pH 7 e ainda menor a pH 5. A estirpe AG100A é a que apresenta menor acumulação de EtBr. Na estirpe AG100_{TET}, a presença de GLU praticamente não altera a acumulação de EtBr. Para as estirpes AG100A e AG100, a acumulação de EtBr na presença e ausência de GLU é anulada a pH 5. A pH 5 o efeito do CPZ na acumulação de EtBr é mínimo (Figura 36).

Assim, num ambiente rico em protões (pH 5), o efeito de inibição das P-ATPases, dependentes dos canais de cálcio, potássio e sódio, causado pelo CPZ, é praticamente nulo apenas se verificando uma ligeira inibição do efluxo na estirpe AG100_{TET} ao fim de 25 minutos. Assim se conclui que, a inibição das P-ATPases, não afecta a FPM para as bombas RND como o AcrAB-TolC, ou as F-ATPases que garantem o funcionamento dos sistemas ABC da estirpe AG100A. A presença ou ausência de GLU, não tem pois qualquer influência na manutenção do efluxo de EtBr (Figura 36- Gráficos a vermelho).

Num ambiente com escassez em protões (pH 8), o efeito de inibição das P-ATPases causado pelo CPZ conduz a um aumento da acumulação de EtBr, não sendo suprimido ou diminuído mesmo na presença de GLU. Assim, a pH 8 a presença de GLU tem pouca influência no restabelecimento do efluxo de EtBr em qualquer das estirpes inibidas pelo CPZ (Figura 36 - Gráficos a verde).

De notar que, para qualquer das três estirpes, a presença de um ambiente rico em protões, anula completamente o efeito do inibidor CPZ, demonstrando-se que em *E. coli* as ATPases que translocam iões (P-ATPases) não são a fonte primária de protões para a manutenção da FPM, mas sim as F-ATPases (Figuras 35 e 36 - Gráficos a vermelho). Se estas últimas estiverem a funcionar e houver protões suficientes no meio o efluxo activo de EtBr não é afectado.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Tal como anteriormente referido, neste trabalho procurou-se compreender a origem da energia utilizada pelas BE (bombas de efluxo) de *E. coli*, em particular, o seu principal sistema de efluxo, AcrAB-TolC, interferindo no fornecimento desta energia e observando como isso pode afectar a actividade de efluxo. Depois de seleccionados os compostos que, na literatura, são apontados como possíveis inibidores da actividade de efluxo em *E. coli*, tais como desacopladores (CCCP e 2,4-DNP), inibidores das ATPases membranares (NaN_3 e Na_3VO_4) e inibidores dos canais de cálcio (TZ e CPZ), foi utilizado um método fluorimétrico semi-automático que detecta em tempo real, a acumulação e efluxo do brometo de etídeo (EtBr), com o objectivo de avaliar a sua actividade inibitória e inferir da sua acção sobre a bioenergética do processo de transporte de EtBr em *E. coli*.

Iniciou-se o estudo pela determinação da CMI e CMB. Tal como observado na Tabela 7, a estirpe AG100A, apresenta susceptibilidade ao EtBr 30 vezes superior à estirpe AG100. O mesmo acontece para o composto TZ, apresentando um valor de CMI 4 vezes inferior à estirpe AG100. No que respeita ao composto CPZ, este apresenta um valor de CMI 3 vezes inferior. Podendo-se inferir que quando o sistema AcrAB-TolC está inactivado, outros sistemas de efluxo substituem esta actividade, embora menos eficientemente, como se demonstra pelas CMIs menores dos compostos para a estirpe AG100A.

No caso dos compostos CCCP, 2,4-DNP, NaN_3 e Na_3VO_4 , o valor de CMI para a estirpe AG100 e AG100A é o mesmo. Sabe-se que o genoma de *E. coli* tem várias BE que são homólogas ao AcrB (86), ou seja, mesmo tendo o sistema AcrAB-TolC inactivado, alguns compostos podem também ser extrusados por outras bombas homólogas ao AcrAB-TolC ou por outro sistema de efluxo que use directamente a energia da hidrólise de ATP, constituindo os sistemas de transporte primários como os sistemas ABC.

Do estudo efectuado neste trabalho, sobre o transporte de EtBr por fluorimetria em tempo real em *E. coli*, podemos concluir que:

- O protocolo de fluorimetria no Rotor-Gene 3000TM, que constitui um método semi-automático, detecta acumulação e efluxo de EtBr em tempo-real, e no qual podem ser alteradas condições como a temperatura e o pH, se mostrou adequado aos objectivos e hipóteses colocadas desde que se cumpram os requisitos e condições seguintes: i) a concentração de EtBr livre no ambiente extracelular em cada ensaio, deverá permitir o estabelecimento do equilíbrio entre a entrada por difusão passiva do EtBr e a sua saída por efluxo activo, não afectando de alguma forma a viabilidade celular, ii) a concentração de composto a testar, como possível inibidor do efluxo, não deverá exceder 1/2 da CMI para a estirpe a ser testada, de modo a não afectar a viabilidade celular; iii) o composto ou mesmo o solvente utilizado, não devem de interferir com o sinal de fluorescência no termociclador de tempo real, iv) deverão ser dadas às células condições ideais de fornecimento de energia (glucose a 0,4%) em pelo menos um tubo com o composto em teste para garantir que, mesmo nas condições óptimas de fornecimento de energia, o efeito inibitório do composto sobre o efluxo é visível;
- A acumulação de EtBr aumenta na presença dos compostos inibidores de bombas de efluxo (IBEs) seleccionados para este trabalho;
- O sistema AcrAB-TolC é altamente susceptível à dissipação da FPM promovida pelos desacopladores 2,4-DNP e CCCP, ressaltando a importância que a manutenção da FPM tem para a eficiente actividade do sistema AcrAB-TolC e consequentemente para o efluxo de EtBr em *E. coli*;
- Quando se inibe directamente a acção das ATPases, que garantem a FPM, por recurso a inibidores de V, F e P-ATPases membranares, como o NaN₃ (V-ATPases) e o Na₃VO₄ (F e P-ATPases), verifica-se um substancial aumento da acumulação de EtBr nas células, pois estas não conseguem manter o potencial de membrana dada a diminuição do transporte de protões para o meio extracelular;
- Na presença de inibidores específicos das P-ATPases, como as fenotiazinas CPZ e TZ, ocorre significativa inibição do efluxo de EtBr nas estirpes AG100 e AG100_{TET} na presença e na ausência de glucose (GLU). Os inibidores dos canais

de cálcio não vêm o seu efeito afectado pela GLU tal como os restantes inibidores de ATPases testados;

- De todos os compostos testados, o Na_3VO_4 , foi o que revelou um maior efeito inibitório, não sendo um efeito inibitório letal. Tal observação evidencia que este composto é específico das ATPases não essenciais envolvidas no transporte de iões a nível membranar, não sendo a inibição específica do sistema AcrAB-TolC, mas sim de todas as BE que usam a energia proveniente da FPM acoplada às ATPases inibidas por este composto (F e P-ATPases) (13, 78, 133). A GLU, como fonte de energia alternativa, tem pouca capacidade para alterar/superar o efeito do Na_3VO_4 , pois a ligação entre a produção de ATP ao nível das vias metabólicas e a sua utilização para gerar FPM para as BE se encontra bloqueada. O Na_3VO_4 será então um excelente candidato, para futuros estudos, como adjuvante de quimioterapia por inibição do efluxo de agentes quimioterapêuticos;
- A acumulação e efluxo de EtBr em *E. coli* são dependentes da energia disponível na célula, sendo o seu efluxo afectado pelo pH e pela disponibilidade em GLU no meio extracelular;
- A GLU, como fonte de energia e a pH fisiológico (pH 7) ou a pH 8, estimula a produção/manutenção da FPM pelo acoplamento com a produção protónica pelas ATPases, o que contraria a acção inibitória do 2,4-DNP e do CCCP por dissipação e desacoplamento do potencial protónico, sobretudo na estirpe AG100_{TET} onde este efeito é mais notório dado o elevado número de cópias do sistema AcrAB-TolC que estão a operar na dependência da FPM;
- Num ambiente rico em protões (pH 5) o efeito de dissipação do potencial protónico causado pelo CCCP, sobre a acumulação de EtBr é rapidamente suprimido, ou seja, a pH 5 a actividade do desacoplamento do potencial protónico provocada pelo CCCP, é rapidamente suprimida e a presença ou ausência de GLU não tem influência sobre a manutenção da actividade de efluxo de EtBr em *E. coli*. Num ambiente com escassez em protões (pH 8) o efeito de dissipação do potencial protónico causado pelo CCCP, sobre a acumulação de EtBr é lentamente suprimido na ausência de GLU, o que claramente promove a acumulação de EtBr. Uma vez fornecida GLU ao meio, a glicólise é activada

bem como as ATPases, as quais vão gerar uma maior disponibilidade de prótons, para o restabelecimento do potencial prótonico, que garante o retomar do efluxo de EtBr pelo sistema AcrAB-TolC;

- As outras BE que substituem o sistema AcrAB-TolC no efluxo de EtBr, na estirpe AG100A não recorrem à FPM para actuar, não sendo afectadas pela dissipação causada pela presença do desacoplador CCCP, pela escassez em prótons (pH 8), ou pela presença ou ausência de GLU, a qualquer um dos três pH testados, na ausência de IBes. São provavelmente BE dependentes da energia gerada directamente pela hidrólise do ATP, pertencentes ao sistema ABC, pois apenas quando estão presentes no meio IBes específicos para estas bombas é possível inibir o efluxo de EtBr pela estirpe AG100A;
- Num ambiente rico em prótons (pH 5), o efeito de inibição das ATPases membranares causado pelo Na_3VO_4 , que conduz a um aumento da acumulação de EtBr, é grandemente diminuído e a presença de GLU tem grande influência no retomar do efluxo de EtBr pelo sistema AcrAB-TolC e pelos sistemas que o substituem na estirpe AG100A. De notar que na presença de sobreexpressão do sistema AcrAB-TolC e num ambiente rico em prótons, o efeito do inibidor Na_3VO_4 é completamente anulado, realçando a dependência do sistema AcrAB-TolC da FPM. Num ambiente com escassez em prótons (pH 8), o efeito de inibição das ATPases membranares causado pelo Na_3VO_4 é aumentado, não sendo suprimido ou diminuído mesmo na presença de GLU, mesmo na estirpe com sobreexpressão de AcrAB-TolC (AG100_{TET}). No caso da estirpe AG100A, a inactivação das BE do tipo ABC pelo Na_3VO_4 é directa e significativa, uma vez que estas bombas dependem directamente da energia provida por estas ATPases membranares para poderem operar;
- Num ambiente rico em prótons (pH 5), o efeito de inibição das P-ATPases dependentes dos canais de cálcio, potássio e sódio, causado pelo CPZ, é muito reduzido uma vez que a inibição das P-ATPases não afecta a FPM para as bombas RND (tal como o AcrAB-TolC) operarem, ou as F-ATPases que garantem o funcionamento dos sistemas ABC da estirpe AG100A. A presença ou ausência de GLU não tem pois qualquer influência na manutenção do efluxo de EtBr. Num ambiente com escassez em prótons (pH 8), o efeito de inibição

das P-ATPases causado pelo CPZ conduz a um aumento da acumulação de EtBr, não sendo suprimido ou diminuído mesmo na presença de GLU.

Em resumo, foi possível otimizar a aplicação do método fluorimétrico semi-automático, para monitorização do transporte de EtBr através da parede de *E. coli*, utilizando a fluorimetria em tempo real no Rotor-GeneTM 3000, através da definição dos parâmetros e condições experimentais essenciais para a obtenção de resultados significativos em termos da bioenergética deste efluxo bacteriano. Os resultados mostraram que, o sistema de efluxo intrínseco de EtBr em *E. coli* é maioritariamente efectuado pelo sistema AcrAB-TolC, o qual é controlado directamente pela energia proveniente da FPM transmembranar, a qual é maioritariamente mantida pelas F-ATPases apoiadas secundariamente pelas P-ATPases bacterianas. Todo este sistema está dependente do catabolismo da GLU e da concentração de protões no meio (pH extracelular). Quando o sistema AcrAB-TolC está inactivo, outras BE encarregam-se de efluxar o EtBr, tendo os resultados apontado que estas deverão ser BE dependentes de ATPases, ou seja, do tipo ABC. De todos os compostos testados, o mais eficiente na inibição do transporte de EtBr em *E. coli* foi o Na₃VO₄, ao inibir directamente a fonte primordial de protões para a FPM bacteriana, as F-ATPases. O segundo mais eficiente foi a fenotiazina CPZ que inibe preferencialmente as P-ATPases bacterianas, as quais actuam como suporte secundário para a manutenção da FPM, ao translocarem catiões por protões.

Contribuiu-se assim para um melhor conhecimento da bioenergética do efluxo em *E. coli*. Uma vez que a resistência intrínseca das estirpes de *E. coli* é afectada pelos IBES testados tais como o Na₃VO₄, CPZ e TZ, estes efeitos podem vir a ser importantes na pesquisa e desenvolvimento de novas e mais eficazes terapias antimicrobianas.

4.1. Perspectivas Futuras

Sendo a resistência bacteriana aos antibióticos um aspecto do conhecimento actualmente em grande expansão, a acção das bombas de efluxo (BE), e a sua interligação com outros mecanismos de regulação do transporte celular, como o da síntese de porinas, é hoje uma realidade que se terá de ter em conta quando se procura explicar o fenómeno conhecido de médicos e microbiologistas de que à medida que se acentua o uso de um antibiótico, maior a rapidez no aparecimento de estirpes resistentes. Os investigadores são unânimes em afirmar que o antibiótico é um factor de selecção que privilegia as bactérias que possuem determinantes genéticos para a resistência, seja as que adquiriram genes de resistência ou uma mutação de resistência, seja por aumento dos fenómenos associados de resistência dita fisiológica ou aumento da expressão e da actividade das BE.

Certamente que o desenvolvimento de inibidores específicos de BE, nomeadamente aqueles que interfiram nos requisitos energéticos específicos deste efluxo, facilitará grandemente a quimioterapia antibacteriana, podendo tornar bactérias resistentes, em susceptíveis a doses terapêuticas normais, e como tal permitir um reaproveitamento do actual arsenal quimioterapêutico e assim contribuir para o combate ao flagelo da resistência aos antibióticos.

A tecnologia e metodologia aqui aplicada e optimizada, tendo em conta os resultados obtidos, poderá ser uma enorme mais valia na determinação em tempo real de novos inibidores e das melhores condições ambientais, para que se possa prevenir e combater a multirresistência por BE.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Amaral, L., M. Viveiros e Molnar, J.** 2004. Antimicrobial activity of phenothiazines. *In Vivo*. **18**(6): 725-732.
2. **Amaral, L., M. Martins, e M. Viveiros.** 2007. Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by compounds that affect the activity of efflux pumps. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**(6): 1237–1246.
3. **Barbosa, T. M., S. B. Levy.** 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist. Updat.* **3**(5): 303–311.
4. **Benabe, J. E., L. A. Echegoyen, B. Pastrana, e M. Martinez-Maldonado.** 1987. Mechanism of inhibition of glycolysis by vanadate. *J. Biol. Chem.* **262**(20): 9555-9560.
5. **Berg, H. C.** 2004. *E. coli* in motion. Biological and Medical physics biomedical engineering. Springer. Nova York, E.U.A.
6. **Betsy, T. e J. Keogh.** 2005. *Microbiology Demystified*. (1ª ed.), McGraw-Hill. Nova York, E.U.A.
7. **Bibi, E. e R. Edgar.** 1997. MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J. Bacteriol.* **179**(7): 2274–2280.
8. **Blair, J. M. e L. J. V. Piddock.** 2009. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**(5):512-519.

9. **Bordignon, E., M. Grote e E. Schneider.** 2010. The maltose ATP-binding cassette transporter in the 21st century – towards a structural dynamic perspective on its mode of action. *Mol. Microbiol.* **77**(6):1354-1366.
10. **Borges-Walmsley, M. I., K. S. McKeegan e A. R. Walmsley.** 2003. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.* **376**(Pt 2): 313–338.
11. **Borths, E. L., B. Poolman, R. N. Hvorup, K. P. Locher, e D. C. Rees.** 2005. In vitro functional characterization of BtuCD-F, the *Escherichia coli* ABC transporter for vitamin B₁₂ uptake. *Biochemistry.* **44**(49): 16301-16309.
12. **Bowler, M. W., M. G. Montgomery, A. G. W. Leslie, e J. E. Walker.** 2006. How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**(23): 8646-8649.
13. **Bowman, E. J., A. Siebers, e K. Altendorf.** 1988. Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**(21): 7972-7976.
14. **Boyer, P.** 1997. The ATP Synthase – A Splendid Molecular Machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 717-749.
15. **Brooks, G. F., K. C. Carroll, J. S. Butel, S. A. Morse.** 2007. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. (24^a ed.), McGraw-Hill Medical. Londres, Reino Unido.
16. **Buehler, L. K., S. Kusumoto, H. Zhang, e J. P. Rosenbusch.** 1991. Plasticity of *Escherichia coli* porin channels. Dependence of their conductance on strain and lipid environment. *J. Biol. Chem.* **266**(36): 24446-24450.

17. **Capaldi, R., e R. Aggeler.** 2002. Mechanism of the F_1F_0 -type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem. Sci.* **27**(3): 154-160.
18. **Castillo-Keller, M., P. Vuong, e R. Misra.** 2006. Novel mechanism of *Escherichia coli* porin regulation. *J. Bacteriol.* **188**(2): 576–586.
19. **Cho, H., Y. Oh, S. Park, e Y. Lee.** 2001. Concentration of CCCP should be optimized to detect the efflux system in quinolone-susceptible *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **39**(1): 62-66.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth Informational Supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, U.S.A.
21. **Cristóbal, R.E., P. A. Vincent e R. A. Salomón.** 2006. Multidrug resistance pump AcrAB-TolC is required for high-level, Tet(A)-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**(1): 31-36.
22. **Davies, D. R., e W. G. J. Hol.** 2004. The power of vanadate in crystallographic investigations of phosphoryl transfer enzymes. *FEBS Lett.* **577**(3): 315–321.
23. **de Sousa, J. C. F.** 2000. Enterobacteriaceae, pp. 99-109. *In* Microbiologia, vol. 2. Ferreira, W. e J. C. F. Sousa. Edições Lidel. Lisboa, Portugal.
24. **de Sousa, J. C.** 2006. Manual de antibióticos antibacterianos. (2ª ed), Edições Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal.
25. **Deckers-Hebestreit, G. e K. Altendorf.** 1996. The F_0F_1 -type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F_0 complex. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 791-824.

26. **Delcour, A. H.** 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**(5): 808–816.
27. **Dimroth, P., C. Ballmoos, T. Meier e G. Kaim.** 2003. Electrical fuels rotary ATP synthase. *Structure.* **11**(12): 1469-1473.
28. **Doebler, J. A.** 2000. Effects of protonophores on membrane electrical characteristics in NG108-15 cells. *Neurochemical Res.* **25**(2): 263–268.
29. **Elkins, C. A. e H. Nikaido.** 2003. 3D structure of AcrB: the archetypal multidrug efflux transporter of *Escherichia coli* likely captures substrates from periplasm. *Drug Resist. Updat.* **6**(1): 9–13.
30. **Elkins, C. A. e L. B. Mullis.** 2006. Mammalian steroid hormones are substrates for the major RND- and MFS- type tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**(3): 1191-1195.
31. **Faia, A. M. e L. T. Castro.** 1998. Metabolismo microbiano produtor de energia, pp. 105-116. *In* Microbiologia, vol. 1. Ferreira, W. F. C. e J. C. F. Sousa. Edições Lidel. Lisboa, Portugal.
32. **Fillingame, R.** 1997. Coupling H^+ transport and ATP synthesis in F₁F₀-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. *J. Exp. Biol.* **200**(Pt 2): 217-224.
33. **Fritz, M. e V. Müller.** 2007. An intermediate step in the evolution of ATPases - the F₁F₀-ATPase from *Acetobacterium woodii* contains F-type and V-type rotor subunits and is capable of ATP synthesis. *FEBS J.* **274**(13): 3421-3428.

- 34. Fritz, M., A. L. Klyszejko, N. Morgner, J. Vonck, B. Brutschy, D. J. Muller, T. Meier. e V. Müller.** 2008. An intermediate step in the evolution of ATPases - a hybrid F_O-V_O rotor in a bacterial Na⁺ F₁F_O ATP synthase. *FEBS J.* **275**(9): 1999-2007.
- 35. Functional Membrane Proteomics.** From transport machineries to dynamic assemblies and networks. Johann Wolfgang Goethe Universität, site: <http://www.sfb628.uni-frankfurt.de/> acedido em Agosto de 2010.
- 36. Gage, D. J. e F. C. Neidhardt.** 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to the uncoupler of oxidative phosphorylation 2,4-dinitrophenol. *J. Bacteriol.* **175**(21): 7105-7108.
- 37. Gallagher, S. R. e R. T. Leonard.** 1982. Effect of vanadate, molybdate, and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. *Plant Physiol.* **70**(5): 1335-1340.
- 38. Gerlach, J. H., J. A. Endicott, P. F. Juranka, G. Henderson, F. Sarangi, K. L. Deuchars e V. Ling.** 1986. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature.* **324**(6096): 485-489.
- 39. Gootz, T. D.** 2006. The forgotten Gram-negative bacilli: What genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. *Biochem. Pharmacol.* **71**(7): 1073-1084.
- 40. Gordon, J. A.** 1991. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol.* **201**: 477-482.
- 41. Hancock, R.** 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.* **5**(1): 37-42.

42. **Hilario, E., e J. P. Gogarten.** 1998. The prokaryote-to-eukaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits. *J. Mol. Evol.* **46**(6):703–715.
43. **Horisberger, J. D.** 2004. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)*. **19**: 377-387.
44. **Hulley, P. A., M. M. Conradie, C. R. Langeveldt, e F. S. Hough.** 2002. Glucocorticoid-induced osteoporosis in the rat is prevented by the tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate. *Bone*. **31**(1): 220–229.
45. **Hunke, S., S. Dröse e E. Scheneider.** 1995. Vanadate and bafilomycin A₁ are potent inhibitors of the ATPase activity of the reconstituted bacterial ATP-binding cassette transporter for maltose (MALFGK₂). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**(2): 589-594.
46. **Hutcheon, M. L., T. M. Duncan, H. Ngai, e R. L. Cross.** 2001. Energy-driven subunit rotation at the interface between subunit a and the c oligomer in the F_O sector of *Escherichia coli* ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**(15): 8519–8524.
47. **Ishmukhametov, R. R., J. B. Pond, A. Al-Huqail, M. A. Galkin, e S. B. Vik.** 2008. ATP synthesis without R210 of subunit a in the *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1777**(1): 32–38.
48. **Ito, M. e Y. Ohnishi.** 1981. Isolation of *Escherichia coli* mutants which are resistant to an inhibitor of H⁺-ATPase, tributyltin and also to uncouplers of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **136**(2): 225-230.
49. **Jana, B., S. Panja, S. Saha e T. Basu.** 2009. Mechanism of protonophores-mediated induction of heat-shock response in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* **9**:20.

50. **Jernaes, M. W., e H. B. Steen.** 1994. Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: influx and efflux of ethidium bromide. *Cytometry* **17**(4):302-309.

51. **Junge, W., H. Lill, e S. Engelbrecht.** 1997. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotator mechanics. *Trends in biochemical Sciences.* **22**(11): 420-423.

52. **Kayser, F. H.** 2005. General bacteriology, pp. 146-228. *In* Medical microbiology, Kayser, F. H., K. A. Bienz, J. Eckert, e R. M. Zinkernagel. Thieme. Nova York, E.U.A.

53. **Kumar, A. e H. P. Schweizer.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**(10): 1486– 1513.

54. **Lambert, B. e J. Le Pecq.** 1984. Effect of mutation, electric membrane potential, and metabolic inhibitors on the accessibility of nucleic acids to ethidium bromide in *Escherichia coli* cells. *Biochemistry.* **23**(1): 166-176.

55. **Langton, K. P., Henderson, P. J. F. e Herbert, R. B.** 2005. Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism? *Nat. Prod. Rep.* **22**(4): 439-451.

56. **Lenhinger, A. L., D. L. Nelson e M. M. Cox.** 2005. Principles of biochemistry. (4^a ed.), W. H. Freeman. Nova York, E.U.A.

57. **León, J. L. e S. H. Crespo.** 2005. Microbiología clínica: Determinación de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima bactericida, pp. 127-132. *In* Manual práctico de microbiología. (3^a ed.), Gamazo, C., I. López-Goñi e R. Díaz. Masson, S. A. Barcelona, Espanha.

58. **Levy, S. B.** 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**(4): 695-703.

59. **Levy, S. B. e B. Marshall.** 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine Supplement*. **10**(12):S122-S129.
60. **Lewis, K., e O. Lomovskaya.** 1992. *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**(19): 8938-8942.
61. **Li, X-Z e H. Nikaido.** 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* **69**(12):1555-1623.
62. **Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore e J. Darnell.** 2000. *Molecular Cell Biology*. (4^a ed.), W. H. Freeman, Nova York, E.U.A.
63. **Lomovskaya, O., H. I. Zgurskaya, M. Totrov e W. J. Watkins.** 2007. Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**(1): 56-65.
64. **Madigan, M. T., J. M. Martinko e J. Parker.** 2003. *Brock biology of microorganisms*. (10^a ed.), Pearson Education, Inc. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ, E.U.A.
65. **Mahamoud, A., J. Chevalier, S. Alibert-Franco, W. V. Kern e J-M. Pagès.** 2007. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**(6):1223–1229.
66. **Marquez, B.** 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*. **87**(12): 1137-1147.
67. **Martins, A., G. Spengler, L. Rodrigues, M. Viveiros, J. Ramos, M. Martins, I. Couto, S. Fanning, J. Pagès, J. Bolla, J. Molnar, e L. Amaral.** 2009. pH modulation of efflux pump activity of multi-drug resistant *Escherichia coli*: Protection during its passage and eventual colonization of the colon. *PLoS ONE*. **4**(8): e6656.

- 68. Martins, M., M. Viveiros e L. Amaral.** 2008. Inhibitors of Ca^{2+} and K^{+} transport enhance intracellular killing of *M. tuberculosis* by non-killing macrophages. In *Vivo*. **22**(1): 69-75.
- 69. Martins, M., I. Couto, M. Viveiros, e L. Amaral.** 2010. Identification of efflux-mediated multi-drug resistance in bacterial clinical isolates by two simple methods, pp. 143-157. In *Methods in molecular biology: Antibiotic resistance protocols*. (2^a ed.), Gillespie, S. H. e T. D. McHugh. Springer Protocols, Humana Press. Hertfordshire, Reino Unido.
- 70. Matsuno-Yagi, A. e Y. Hatefi.** 1989. Uncoupling of oxidative phosphorylation: different effects of lipophilic weak acids and electrogenic ionophores on the kinetics of ATP synthesis. *Biochemistry*. **28**(10): 4361-4374.
- 71. Matsuo, T., J. Chen, Y. Minato, W. Ogawa, T. Mizushima, T. Kuroda, e T. Tsuchiya.** 2008. SmdAB, a heterodimeric ABC-type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* **190**(2): 648–654.
- 72. Mitchell, P.** 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Cambridge Phil Soc.* **41**:445-502.
- 73. Molloy, M. P., B. R. Herbert, M. B. Slade, T. Rabilloud, A. S. Nouwens, K. L. Williams e A. A. Gooley.** 2000. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur. J. Biochem.* **267**(10): 2871-2881.
- 74. Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita e A. Yamaguchi.** 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*. **419**(6907): 587-593.
- 75. Murray, P. R., K. S. Rosenthal e M. A. Pfaller.** 2005. Bacterial metabolism and growth, pp. 25-30. In *Medical Microbiology*. (5^a ed.), Mosby. St. Louis, E.U.A.

- 76. Nakamoto, R. K., C. J. Ketchum e M. K. Al-Shawi.** 1999. Rotational coupling in the F₀F₁ ATP synthase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**:205–34.
- 77. NCBI.** 2010. National Center for Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov. Acedido em Janeiro, 2010.
- 78. Nechay, B. R.** 1984. Mechanisms of action of vanadium. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **24**: 501-524.
- 79. Niikura, K.** 2006. The key issue regarding the therapeutic usefulness of V-ATPase inhibitors is their selectivity in the inhibition. Vacuolar ATPase as a drug discovery target. *Drug News Perspect.* **19**(3): 139-144.
- 80. Nikaido, H. e M. H. Saier, Jr.** 1992. Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science. Cellular membranes: Articles.* **258**(5084): 936-942.
- 81. Nikaido, H.** 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**(6): 3905-3908.
- 82. Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**(20): 5853-5859.
- 83. Nikaido, H.** 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **78**:8.1-8.28.
- 84. Nishino, K., E. Nikaido e A. Yamaguchi.** 2009. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**(5): 834–843.
- 85. Noumi, T., M. Maeda e M. Futai.** 1987. Mode of inhibition of sodium azide on H⁺-ATPase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **213**(2): 381-384.

- 86. Okuso, H., D. Ma, e H. Nikaido.** 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* **178**(1): 306-308.
- 87. Pagès, J-M., M. Masi e J. Barbe.** 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol. Med.* **11**(8): 382-389.
- 88. Pagès, J-M. e L. Amaral.** 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**(5): 826-833.
- 89. Paixão, L., L. Rodrigues, I. Couto, M. Martins, P. Fernandes, C. Carvalho, G. A. Monteiro, F. Sansonetty, L. Amaral e M. Viveiros.** 2009. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *J. Biol. Eng.* **3**(18).
- 90. Pao, S. S., I. T. Paulsen e M. H. Saier.** 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(1): 1-34.
- 91. Paulsen, I. A.** 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**(5): 446–451.
- 92. Paulsen, I. T., M. H. Brown e R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**(4): 575-608.
- 93. Pederson, P. L.** 2007. Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J. Bioener. Biomembr.* **39**(5-6):349-355.

94. **Pereira, M. B. P., R. Tisi, L. G. Fietto, A. S. Cardoso, M. M. França, F. M. Carvalho, M. J. M. Trópia, E. Martegani, I. M. Castro e R. L. Brandão.** 2008. Carbonyl cyanide m -chlorophenylhydrazone induced calcium signaling and activation of plasma membrane H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. **8**(4): 622–630.

95. **Piddock, L. J.** 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin. Microbiol. Rev. **19**(2): 382–402.

96. **Piddock, L. J.** 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. Nat. Rev. Microbiol. **4**(8):629-636.

97. **Ponte-Sucre, A.** 2009. ABC transporters in microorganisms. Research, innovation and value as targets against drug resistance. Caister Academic Press. Norfolk, Reino Unido.

98. **Poole, K.** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J. Antimicrob. Chemother. **56**(1): 20–51.

99. **Pos, K. P.** 2009. Trinity revealed: Stoichiometric complex assembly of a bacterial multidrug efflux pump. Proc Natl Acad Sci U S A. **106**(17): 6893-6894.

100. **Poulakou, G., e H. Giamarellou.** 2009. Multidrug-resistant Gram-negative infections. What are the treatment options? Drugs. **69**(14): 1879-1901.

101. **Prescott, L. M., J. P. Harley e D. A. Klein.** 2002. Microbiology. (5^a ed.), McGraw-Hill. Nova york, E.U.A.

102. **Riondet, C., R. Cachon, Y. Waché, G. Alcaraz e C. Diviès.** 1999. Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential. Eur. J. Biochem. **262**(2): 595-599.

- 103. Rodrigues, L., D. Wagner, M. Viveiros, D. Sampaio, I. Couto, M. Vavra, W. V. Kern e L. Amaral.** 2008. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. J. Antimicrob. Chemother. **61**(5): 1076-1082.
- 104. Saier, M. H. Jr., I. T. Paulsen, M. K. Sliwinski, S. S. Pao, R. A. Skurray e H. Nikaido.** 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. FASEB J. **12**(3): 265-274.
- 105. Sánchez-Ferrer, C. F., J. Marín, M. Lluch, A. Valverde e M. Salaices.** 1988. Actions of vanadate on vascular tension and sodium pump activity in cat isolated cerebral and femoral arteries. Br. J. Pharmacol. **93**(1): 53-60.
- 106. Seeger, M. A., K. Diederichs, T. Eicher, L. Brandstatter, A. Schiefner, F. Verrey e K. M. Pos.** 2008. The AcrB efflux pump: conformational cycling and peristalsis lead to multidrug resistance. Curr. Drug Targets. **9**(9): 729-749.
- 107. Sharma, S. e A. L. Davidson.** 2000. Vanadate-induced trapping of nucleotides by purified maltose transport complex equires ATP hydrolysis. J. Bacteriol. **182**(23): 6570–6576.
- 108. Shukla, S. S., K. L. Dorris, e B. V. Chikkaveeraiah.** 2009. Photocatalytic degradation of 2,4-dinitrophenol. J. Hazard. Mater. **164**(1): 310–314.
- 109. Silva, T. L., A. Reis, C. Hewitt e J. C. Roseiro.** 2004. Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. Boletim de Biotecnologia. **77**:32-40.

110. Spengler, G., A. Martins, Z. Schelz, L. Rodrigues, L. Aagaard, M. Martins, S.S. Costa, I. Couto, M. Viveiros, S. Fanning, J. Kristiansen, J. Molnar, e L. Amaral. 2009. Characterization of intrinsic efflux activity of *Enterococcus faecalis* ATCC29212 by a semi-automated ethidium bromide method. In Vivo. **23**(1): 81-88.
111. Spengler, G., M. Viveiros, M. Martins, L. Rodrigues, A. Martins, J. Molnar, I. Couto, e L. Amaral. 2009. Demonstration of the activity of P-glycoprotein by a semi-automated fluorometric method. Anticancer Research. **29**(6): 2173-2177.
112. Stege, A., A. Krühn, H. Lage. 2010. Overcoming multidrug resistance by RNA interference, pp. 447-465. In Methods in molecular biology: Multi-drug resistance in cancer. E.U.A.
113. Stratton, C. 2002. Emphasis on efflux CME. 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego, California, 27 – 30 Setembro. www.medscape.com/viewarticle/443387. Acedido em Julho, 2009.
114. Sussman, M. R. e C. W. Slayman. 1983. Modification of the *Neurospora crassa* plasma membrane [H⁺]-ATPase with N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide. J. Biol. Chem. **258**(3): 1839-1843.
115. Svergun, D., I. Aldag, T. Sieck, K. Altendorf, M. Koch, D. Kane, M. Kozin, e G. Gruber. 1998. A Model of the Quaternary Structure of the *Escherichia coli* F1 ATPase from X-Ray Solution Scattering and Evidence for Structural Changes in the Delta Subunit during ATP Hydrolysis. Biophys. J. **75**(5): 2212-2219.
116. Tan, C. A. e M. F. Roberts. 1996. Vanadate is a potent competitive inhibitor of phospholipase C from *Bacillus cereus*. Biochim. Biophys. Acta **1298**(1): 58-68.

117. **Taylor, P., F. Schoenknecht, J. Sherris, e E. Linner.** 1983. Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for *Staphylococcus aureus*: Influence and significance of technical factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**(1): 142-150.

118. **Tenover, F. C.** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. 2006. *Am. J. Infect. Control.* **34**(5 Suppl 1): S3–S10.

119. **Thanacoody, H. K. R.** 2007. Thioridazine: resurrection as an antimicrobial agent? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **64**(5): 566–574.

120. **Thiebault, F., F. Kiss, R. Bonaly, e J. Coulon.** 2002. Effect of sodium orthovanadate on glycosylation of the phosphopeptidomannans involved in the cell–cell aggregation of the yeast *Kluyveromyces bulgaricus*. *Carbohydr. Res.* **337**(20): 1873–1877.

121. **Tikhonova, E. B. e H. I. Zgurskaya.** 2004. AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex. *J. Biol. Chem.* **279**(31):32116-24.

122. **Tommasino, M. e R. A. Capaldi.** 1985. Effect of dicyclohexylcarbodiimide on unisite and multisite catalytic activities of the adenosinetriphosphatase of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **24**(15):3972-3976.

123. **Tretter, L., C. Chinopoulos, e V. Adam-Vizi.** 1998. Plasma Membrane Depolarization and disturbed Na⁺ homeostasis induced by the protonophore Carbonyl Cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenyl-hydrazon in isolated nerve terminals. *Mol. Pharmacol.* **53**(4):734–741.

124. **Tu, S., C. Wijey, G. Paoli, P. Irwin e A. Gehring.** 2004. Detection of viable bacteria cells by bioluminescence: a bioenergetic approach. *J Rapid Methods Autom Microbiol* **12**(3): 207-219.

- 125. Turner, R. J., D. E. Taylor e J. H. Weiner.** 1997. Expression of *Escherichia coli* TehA gives resistance to antiseptics and disinfectants similar to that conferred by multidrug resistance efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**(2): 440-444.
- 126. Viveiros, M., A. Jesus, M. Brito, C. Leandro, M. Martins, D. Ordway, A. M. Molnar, J. Molnar, e L. Amaral.** 2005. Inducement and reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* K-12 and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(8): 3578-3582.
- 127. Viveiros, M., A. Martins, L. Paixão, L. Rodrigues, M. Martins, I. Couto, E. Fahnrich, W. Kern, e L. Amaral.** 2008. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **31**(5): 458-462.
- 128. Viveiros M., C. Leandro e L. Amaral.** 2003. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**(3): 274-278.
- 129. Viveiros, M., L. Rodrigues, M. Martins, I. Couto, G. Spengler, A. Martins, e L. Amaral.** 2010. Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-automated fluorometric system, pp. 159-172. *In* Methods in Molecular Biology: Antibiotic Resistance Protocols. (2^a ed.), Gillespie, S. H. e T. D. McHugh. Springer Protocols, Humana Press. Hertfordshire, Reino Unido.
- 130. Viveiros, M., M. Dupont, L. Rodrigues, I. Couto, A. Davin-Regli, M. Martins, J-M. Pagès e L. Amaral.** 2007. Antibiotic Stress, Genetic Response and Altered Permeability of *E. coli*. *PLoS One.* **2**(4): e365.

- 131. Viveiros, M., M. Martins, I. Couto, L. Rodrigues, G. Spengler, A. Martins, J. E. Kristiansen, J. Molnar, e L. Amaral.** 2008. New methods for the identification of efflux mediated MDR bacteria, genetic assessment of regulators and efflux pump constituents, characterization of efflux systems and screening for inhibitors of efflux pumps. *Curr Drug Targets* **9**(9):760-778.
- 132. Wade, M. M. e Y. Zhang.** 2006. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**(5): 936–941.
- 133. Wakai, S., A. Ohmori, T. Kanao, T. Sugio e K. Kamimura.** 2005. Purification and biochemical characterization of the F₁-ATPase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1 and analysis of the *atp* operon. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**(10): 1884-1891.
- 134. Walsh, C.** 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* **406**(6797): 775-781.
- 135. Weber, J., e A. E. Senior.** 2003. ATP synthesis driven by proton transport in F₁F₀-ATP synthase. *FEBS Lett.* **545**(1): 61-70.
- 136. Weber, J. T. e P. Courvalin.** 2005. An Emptying Quiver: Antimicrobial Drugs and Resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **11**(6): 791-793.
- 137. Weingart, H., M. Petrescu, e M. Winterhalter.** 2008. Biophysical Characterization of In- and Efflux in Gram-Negative Bacteria. *Curr Drug Targets*, **9**(9): 789-796.
- 138. White, D.** 2000. Membrane bioenergetics: the proton potential, pp.83-119. *In* The physiology and biochemistry of prokaryotes. (2^a ed.), Oxford University Press. Nova york, E.U.A.

- 139. Yoshida, M., E. Muneyuki, e T. Hisabori.** 2001. ATP Synthase – a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**(9): 669-677.
- 140. Yu, E. W., J. R. Aires e H. Nikaido.** 2003. AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J. Bacteriol.* **185**(19): 5657–5664.
- 141. Zhang, Y., M. M. Wade, A. Scorpio, H. Zhang e Z. Sun.** 2003. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetic by pyrazinoic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**(5): 790–795.